

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Avaliação de respostas metabólicas e de imunidade inata em
pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) alimentados
com dietas suplementadas com vitamina E e submetidos à
variação de temperatura

LÍVIA MARIA GRULI BARBOSA

SÃO CARLOS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Avaliação de respostas metabólicas e de imunidade inata em pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com vitamina E e submetidos à variação de temperatura

Lívia Maria Gruli Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.

SÃO CARLOS-SP

-2011-

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B238ar

Barbosa, Lívia Maria Gruli.

Avaliação de respostas metabólicas e de imunidade inata em pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com vitamina E e submetidos à variação de temperatura / Lívia Maria Gruli Barbosa. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

122 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Peixe. 2. Metabolismo. 3. Imunologia. 4. Nutrição. 5. Aquicultura. 6. Hematologia. I. Título.

CDD: 597 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Avaliação de respostas metabólicas e de imunidade inata
em pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)
alimentados com dietas suplementadas com vitamina E e
submetidos à variação de temperatura**

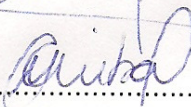
Dissertação de Mestrado de LÍVIA MARIA GRULI BARBOSA

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Moraes



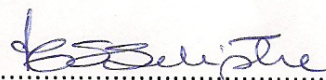
Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal



Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado



Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo



Dedico

Aos meus queridos pais, Fátima e Reginaldo.

A distância e o tempo não apagarão o amor, a dedicação, os ensinamentos e o apoio que vocês sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom e a eternidade da vida.

Aos meus pais, Fátima e Reginaldo, por me darem a vida, por me apoiarem em todas as decisões, por todos os sacrifícios, por todo amor e carinho e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus familiares pela torcida para que eu alcançasse meus objetivos. Em especial, aos meus tios, João e Neide, por me terem como uma filha, e à minha prima Cidinha, por me ter como uma irmã.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes pela orientação com brilhantismo, sabedoria, paciência e amizade.

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal por ter aceitado me co-orientar, mesmo sendo um trabalho fora de sua linha de pesquisa, e pela compreensão e amizade.

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por dispor do seu tempo para me ensinar as técnicas de análise do sistema imunológico.

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), por permitir o uso da infra-estrutura do seu laboratório para determinação da atividade hemolítica do sistema complemento, à Farmacêutica-Bioquímica Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, FCFRP-USP, por contribuir nos ensaios do sistema complemento e ao técnico José Eduardo Cavalcanti Del Lama (FCFRP-USP), pela colaboração nos ensaios do sistema complemento.

À Profa. Dra. Margaret de Castro (FMRP-USP), por ter me permitido realizar a quantificação de cortisol em seu laboratório, e ao técnico José Roberto (FMRP-USP) por ter realizado os ensaios.

À empresa Nova América produtos agropecuários LTDA, em especial seu funcionário Maciel Luiz Ricci, por terem gentilmente cedido os ingredientes do premix vitamínico e mineral e a vitamina E utilizados nesse trabalho.

À doutoranda do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, Marília Almeida Trapp, e seu orientador Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho por ter gentilmente realizado a quantificação de vitamina E nas rações.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução pela ajuda na realização dos experimentos e por ter me recebido tão bem no laboratório. São eles: Araceli Hackbarth, Camila, Cláucia Honorato (Timba), Cleujosí Nunes, Fernanda Moraes, Fernando Fabrizzi, Fernando, Francine Venturini, Gustavo Hojas, Ive Avilez, Lícia Lundstedt, Luciana Almeida, Marcelo Assano, Priscila Rossi, Rodrigo Camilo. Gostaria de agradecer em especial a colega de laboratório e amiga Cleujosí da Silva Nunes (Josi Maria), pela ajuda inestimável em todas as etapas desse trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia pela ajuda no preparo dos esfregaços sanguíneos. São eles: Débora Neris, Joice Rodolpho, Laís Souza, Naiara Dejani, Ricardo Oliveira, Sandra Pereira.

Ao técnico de laboratório Antônio Donizetti (Sr. Toninho), sem o qual esse trabalho não teria sido efetivado, pela dedicação e prontidão em ajudar, e seu irmão Luís Henrique (Piau).

Aos amigos que a vida me deu, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse mais essa etapa. Em especial, Heitor (Tô), Nilton (Ni), Éder (Xuxus), Gabriela (Brigas), Giovanna (Gemeazinha) e Camila (Maninha).

Aos professores da academia, Gabriela, Daniel e Kellyn, pela amizade e por me proporcionarem vários momentos de alegria e diversão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu alcançasse mais este objetivo.

RESUMO

A demanda mundial por produtos pesqueiros é crescente e a piscicultura teve na última década desenvolvimento emergente. Porém, situações estressantes, que favorecem maior incidência de doenças e prejudicam o crescimento dos peixes, são encontradas nas práticas diárias da piscicultura. Assim, tem-se buscado cada vez mais o conhecimento de boas práticas de manejo, a fim de reduzir o estresse e manter os animais saudáveis, reduzindo as perdas na produção. O uso de imunostimulantes, como a vitamina E, na dieta tem sido apontado como uma alternativa para melhorar a resistência dos peixes a doenças em situações de estresse. O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, é uma das principais espécies da fauna aquática brasileira e possui grande importância para a piscicultura comercial. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar algumas respostas metabólicas e de imunidade inata em pacus alimentados com dietas suplementadas com vitamina E e submetidos à variação de temperatura. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3x2, sendo três níveis de vitamina E na ração (0, 100 e 300 mg/kg), três horários de coleta (0, 24 e 72h) e duas condições de temperatura (controlada e variável), com quatro repetições (aquários) por tratamento. As principais respostas ao estresse observadas foram: 1) elevação do cortisol plasmático nos animais submetidos à variação de temperatura, independente da concentração de vitamina E na dieta, 2) hiperglicemia apenas nos animais submetidos à variação de temperatura e alimentados com dieta não suplementada, 3) hiperlactemia nos animais submetidos à variação de temperatura e alimentados com dieta não suplementada e suplementada com 300 mg de vitamina E e 4) os animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E e submetidos à variação de temperatura apresentaram a maior porcentagem de leucócitos granulares, a maior concentração de lisozima sérica e a maior atividade da via alternativa do sistema complemento. Diante disso, a suplementação da ração com 100 mg de vitamina E mostrou-se a melhor para a espécie nas condições experimentais do presente trabalho.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*. Vitamina E. Temperatura. Imunidade inata. Metabolismo. Estresse.

ABSTRACT

Demands for seafood are growing in the whole world and the fish farming industries are in frank development over the last decade. However, stressful conditions, which favor higher incidence of diseases and impair growth in fishes, are usually found in fish farming. Therefore, several studies are focused in the improvement of management to reduce stress and keep the animals healthy, reducing losses in farm production. The use of immunostimulants in the diets, such as vitamin E, has been suggested as an alternative to improve fish resistance to diseases under stressful conditions. Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, is one of the main species from the Brazilian aquatic fauna and is of great importance in fish farming. Hence, the objective of this study was to evaluate the metabolic responses and innate immunity of pacu fed with vitamin E supplemented diets and challenged to temperature variation. The experiment was conducted as a totally randomized design in a factorial scheme 3x3x2, with three levels of dietary vitamin E (0, 100 and 300 mg/kg), three sampling spans (0, 24 and 72h) and two temperature conditions (controlled and variable), with four replicates (tanks) per treatment. The main responses observed to cope with stress were 1) elevation of plasma cortisol in the animals subjected to temperature variation, independent of the concentration of vitamin E in the diet, 2) hyperglycemia only in the animals subjected to temperature variations and fed with not supplemented diets and 3) hyperlactemia in the fish subjected to temperature variation and fed with not supplemented and supplemented diets with 300 mg of vitamin E. Animals fed with diets supplemented with 100 mg of vitamin E and subjected to temperature variation depicted the highest percentage of granular leukocytes, the highest concentration of serum lysozyme and the highest activity of alternative complement pathway. There upon, supplementation with 100 mg of vitamin E seems to be the best one for this species under the studied conditions.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*. Vitamin E. Temperature. Innate immunity. Metabolism. Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma das respostas primárias, secundárias e terciárias ao estresse.....	2
Figura 2: Ponto de ruptura da parede celular bacteriana pela lisozima. NAG=N-acetilglicosamina. NAM=N-acetilmurâmico.....	5
Figura 3: Vias de ativação das proteínas do sistema complemento.....	6
Figura 4: Mecanismo de ação das proteínas do sistema complemento.....	7
Figura 5: Fórmula estrutural do α -Tocoferol (5,7,8-trimetiltocol).....	11
Figura 6: Foto de exemplar de juvenil de pacu obtida em nosso laboratório.....	13
Figura 7: Hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	28
Figura 8: Hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	28
Figura 9: Hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	29
Figura 10: Hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	29
Figura 11: Hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	31
Figura 12: Hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	31
Figura 13: Hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	32
Figura 14: Hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	32
Figura 15: Glóbulos vermelhos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	34
Figura 16: Glóbulos vermelhos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	34
Figura 17: Glóbulos vermelhos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre	

experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	35
Figura 18: Glóbulos vermelhos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	35
Figura 19: Volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	37
Figura 20: Volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	37
Figura 21: Volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	38
Figura 22: Volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	38
Figura 23: Hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	40
Figura 24: Hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	40
Figura 25: Hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	41
Figura 26: Hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	41
Figura 27: Concentração de hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	43
Figura 28: Concentração de hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	43
Figura 29: Concentração de hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	44
Figura 30: Concentração de hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	44

Figura 31: Cortisol plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	46
Figura 32: Cortisol plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	46
Figura 33: Cortisol plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	47
Figura 34: Cortisol plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	47
Figura 35: Glicose plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	49
Figura 36: Glicose plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	49
Figura 37: Glicose plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	50
Figura 38: Glicose plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	50
Figura 39: Lactato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	52
Figura 40: Lactato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	52
Figura 41: Lactato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	53
Figura 42: Lactato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	53
Figura 43: Piruvato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	55
Figura 44: Piruvato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	55

Figura 45: Piruvato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	56
Figura 46: Piruvato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	56
Figura 47: Amônia plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	58
Figura 48: Amônia plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	58
Figura 49: Amônia plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	59
Figura 50: Amônia plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	59
Figura 51: Proteína plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	61
Figura 52: Proteína plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	61
Figura 53: Proteína plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	62
Figura 54: Proteína plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	62
Figura 55: Aminoácidos livres plasmáticos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	64
Figura 56: Aminoácidos livres plasmáticos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	64
Figura 57: Aminoácidos livres plasmáticos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	65

Figura 58: Aminoácidos livres plasmáticos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	65
Figura 59: Sódio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	67
Figura 60: Sódio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	67
Figura 61: Sódio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	68
Figura 62: Sódio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à a variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	68
Figura 63: Potássio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	70
Figura 64: Potássio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	70
Figura 65: Potássio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	71
Figura 66: Potássio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	71
Figura 67: Cloreto plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	73
Figura 68: Cloreto plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	73
Figura 69: Cloreto plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	74
Figura 70: Cloreto plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	74
Figura 71: Glicogênio hepático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	76

- Figura 72: Glicogênio hepático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....76
- Figura 73: Glicogênio hepático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....77
- Figura 74: Glicogênio hepático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....77
- Figura 75: Glicogênio muscular de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....79
- Figura 76: Glicogênio muscular de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....79
- Figura 77: Glicogênio muscular de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....80
- Figura 78: Glicogênio muscular de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....80
- Figura 79: Leucócitos mononucleares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....82
- Figura 80: Leucócitos mononucleares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....82
- Figura 81: Leucócitos mononucleares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....83
- Figura 82: Leucócitos mononucleares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....83
- Figura 83: Leucócitos granulares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....85
- Figura 84: Leucócitos granulares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....85
- Figura 85: Leucócitos granulares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre

experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	86
Figura 86: Leucócitos granulares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	86
Figura 87: Lisozima sérica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	88
Figura 88: Lisozima sérica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	88
Figura 89: Lisozima sérica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	89
Figura 90: Lisozima sérica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	89
Figura 91: Atividade hemolítica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.....	91
Figura 92: Atividade hemolítica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E.....	91
Figura 93: Atividade hemolítica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h.....	92
Figura 94: Atividade hemolítica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção por atividade pesqueira e aquicultura e utilização.....	1
Tabela 2: Formulação base e composição dos nutrientes das dietas experimentais utilizadas no experimento.	17
Tabela 3: Crescimento de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E por 45 dias.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Estresse em peixes.....	2
1.2. Sistema Imune em Peixes.....	4
1.3. Imunoestimulantes.....	9
1.4. <i>Piaractus mesopotamicus</i>	12
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVO.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Dietas experimentais.....	16
4.2. Desenho experimental.....	17
4.3. Parâmetros zootécnicos.....	19
4.4. Hematimetria.....	19
4.5 Determinação dos intermediários metabólicos.....	20
4.6. Avaliação da resposta imune inata.....	23
4.7. Delineamento e análise estatística.....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Variáveis de desempenho.....	26
5.2. Variáveis hematológicas.....	27
5.3. Intermediários metabólicos.....	45
5.4. Resposta imune inata.....	81
6. DISCUSSÃO.....	93
6.1. Cortisol.....	93
6.2. Desempenho.....	95
6.3. Hematologia.....	96
6.4. Metabolismo intermediário.....	99
6.5. Resposta imune inata.....	104
7. CONCLUSÃO.....	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por produtos pesqueiros é crescente e a piscicultura teve na última década emergente desenvolvimento (Tabela 1), exigindo mais estudos sobre nutrição e alimentação referentes às espécies nativas de interesse comercial, para tornar-se uma atividade economicamente viável e de importância para o país (FRASCA-SCORVO et al., 2007). Vale ressaltar ainda que o potencial do Brasil para o desenvolvimento da aquicultura é grande, pois o país possui uma das maiores reservas hídricas mundiais, com aproximadamente 12% da água doce do planeta, clima favorável para criação de espécies, mão de obra abundante, terras disponíveis e crescente demanda do pescado no mercado interno (ANA, 2002).

Com a expansão da piscicultura mundial, pode-se observar um crescente interesse dos produtores na busca de soluções para evitar os prejuízos causados por mortalidade e problemas de produção. Dentre os aspectos importantes para a otimização do cultivo estão aqueles que afetam o desempenho produtivo, a reprodução e a resistência dos animais às doenças, para os quais se têm voltado os esforços científicos na busca de soluções. Situações estressantes, que favorecem maior incidência de doenças e, conseqüentemente, da mortalidade, prejudicando o crescimento dos peixes são encontradas nas práticas diárias da piscicultura (BARTON; IWAMA, 1991; PICKERING, 1981). Assim, tem-se buscado cada vez mais o conhecimento de boas práticas de manejo a fim de reduzir o estresse e, portanto, manter os animais saudáveis, reduzindo as perdas na produção (ASHLEY, 2007; CONTE, 2004; HUNTINGFORD et al., 2006).

Tabela 1. Produção por atividade pesqueira e aquicultura e utilização.

	Ano					
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
	(milhões de toneladas)					
PRODUÇÃO						
Continental						
Captura	8,6	9,4	9,8	10,0	10,2	10,1
Aquicultura	25,2	26,8	28,7	30,7	32,9	35,0
<i>Total</i>	33,8	36,2	38,5	40,6	43,1	45,1
Marinha						
Captura	83,8	82,7	80,0	79,9	79,5	79,9
Aquicultura	16,7	17,5	18,6	19,2	19,7	20,1

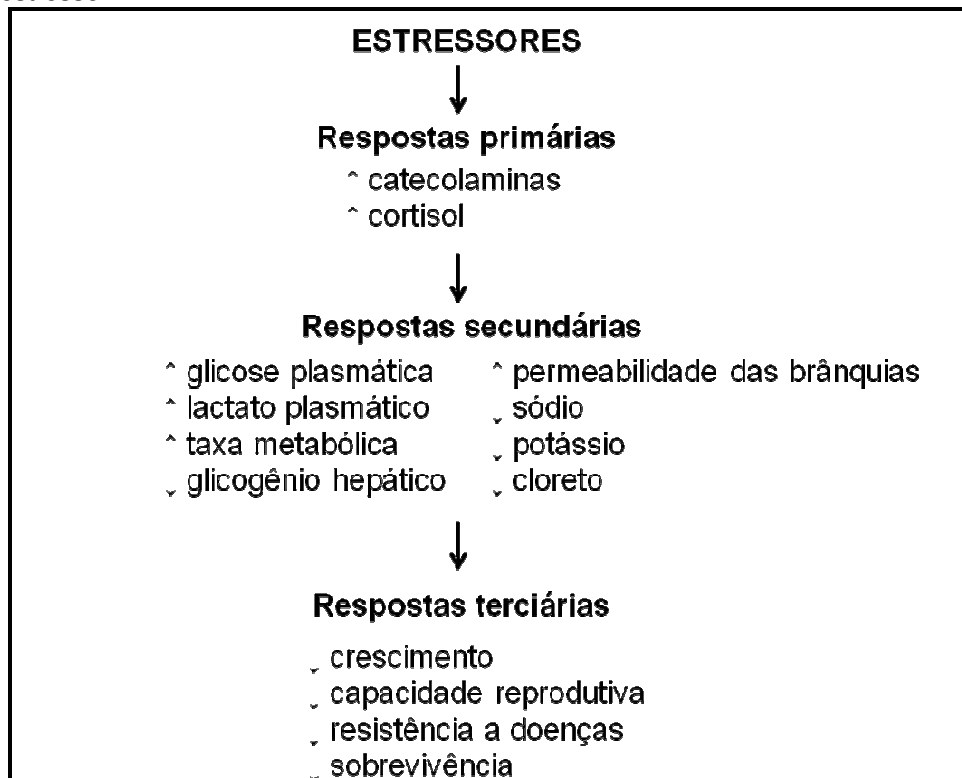
<i>Total</i>	100,5	100,1	98,6	99,2	99,2	100,0
TOTAL CAPTURA	92,4	92,1	89,7	89,9	89,7	90,0
TOTAL AQUICULTURA	41,9	44,3	47,4	49,9	52,5	55,1
UTILIZAÇÃO						
Consumo humano	104,4	107,3	110,7	112,7	115,1	117,8
Uso não alimentício	29,8	29,1	26,3	27,1	27,2	27,3
População (bilhões)	6,4	6,5	6,6	6,7	6,8	6,8
Disponibilidade de peixe <i>per capita</i> (kg)	16,2	16,5	16,8	16,9	17,1	17,2

(Fonte: FAO, 2010)

1.1. Estresse em peixes

Segundo Barton e Iwama (1991) o estresse em peixes é um estado causado por um estressor, resultando em alteração da homeostase. Sua gravidade pode ser quantificada através das respostas geradas pelo animal frente à situação estressante em que se encontra. Assim, as respostas ao estresse são comumente divididas em primárias, secundárias e terciárias (MAZEAUD et al., 1977), de acordo com o nível de organização, sendo muitas delas usadas como indicadores da alteração homeostática nos peixes (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma das respostas primárias, secundárias e terciárias ao estresse.



As respostas primárias referem-se ao reconhecimento do estressor pelo sistema nervoso central (SNC) e caracterizam-se por reações hormonais do eixo Hipotálamo-Pituitária-Interrenais (HPI), resultando na liberação massiva de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteróides (cortisol) no plasma (MOMMSEN et al., 1999).

As respostas secundárias são desencadeadas pelo aumento de cortisol plasmático e são caracterizadas pelo desbalanceamento em vias bioquímicas responsáveis pelo equilíbrio no fornecimento de energia para o organismo (MAZEAUD et al., 1977). Estas respostas podem ser evidenciadas pelas alterações na glicemia, na lactemia e nas reservas de glicogênio hepático e muscular; pelos efeitos hematológicos, como alteração no número de células vermelhas e brancas e, ainda, pelos efeitos hidroeletrólíticos, como alterações nas concentrações plasmáticas de íons (cloreto, sódio, potássio), proteínas e, também, na osmolaridade (WENDELAAR BONGA, 1997).

As respostas terciárias evidenciam a incapacidade dos indivíduos de se adaptarem ou retornarem à homeostase, indicando que um estressor teve intensidade e/ou duração excessiva ou crônica (MAZEAUD et al., 1977). Nesse estágio, observam-se quedas nas taxas de crescimento, na resistência à doenças, na capacidade reprodutiva e na capacidade de natação (BARTON; IWAMA, 1991; IWAMA et al., 2004; MOMMSEN et al., 1999), podendo haver mortalidade e perdas substanciais na produção de peixes. Dessa forma, um manejo efetivo de peixes sob confinamento requer o conhecimento espécie-específico de suas demandas biológicas (PORTZ et al., 2006) a fim de otimizar a produção.

Nos sistemas de cultivo intensivo os peixes são continuamente expostos a situações de estresse, devido às práticas rotineiras como, por exemplo, biometria, transporte, manuseio e vacinação, que induzem alterações nas respostas fisiológicas dos peixes para adaptarem-se às novas situações. Estas mudanças podem ser prolongadas e virem acompanhadas de estresse crônico, intensificando o desequilíbrio homeostático (FALCON et al., 2008).

Dentre os fatores estressantes, a mudança de temperatura configura-se um agente estressor e pode ser uma das principais causas de perda na produção. Sabe-se que a mortalidade de peixes durante períodos de estresse, especialmente no inverno, pode determinar grandes prejuízos aos produtores, em função da queda de resistência e da maior susceptibilidade a doenças. Isso pode

ocorrer por causa de alterações no sistema imunológico causadas pela baixa temperatura, associadas a fatores neuroendócrinos (FALCON et al., 2008). Segundo Watts e colaboradores (2002), durante o inverno a temperatura ambiente pode cair para níveis que podem prejudicar as respostas imunes específicas e inespecíficas, levando a resultados devastadores. Esses autores ressaltam que peixes cultivados são mais afetados pela flutuação de temperatura do que peixes na natureza, o que pode ser explicado em parte pela impossibilidade de se movimentarem por grandes distâncias e afastarem-se da temperatura adversa. Sendo assim, o choque térmico é um agente estressor importante para os peixes, pois causa desbalanços extremos e imediatos nas reações metabólicas destes animais (TANCK et al., 2000). As principais conseqüências advindas desse tipo de estresse são: redução do crescimento e ganho em peso, redução do desempenho reprodutivo e diminuição da resposta imunológica (NIKOSKELAINEN et al., 2004). Além disso, são comuns relatos de mortalidade dos peixes em massa devida a estresse térmico (DONALDSON et al., 2008).

Os principais e mais utilizados indicadores de resposta ao estresse são os níveis plasmáticos de cortisol e de glicose. Os níveis de cortisol são amplamente usados como indicadores gerais e endócrinos de estresse em vertebrados (ABREU et al., 2009; BENFEY; BIRON, 2000; GONÇALVEZ et al., 2010; PICKERING; POTTINGER, 1989; TAKAHASHI et al., 2006; TANCK et al., 2000). Em peixes, bem como em outros animais, as catecolaminas também são liberadas na corrente sanguínea em grandes quantidades imediatamente após o surgimento do estressor, sendo o aumento dos níveis de glicose plasmática uma das principais ações catecolaminérgicas (ANDERSEN et al., 1991), bem como a alteração da função cardiovascular (PERRY; BERNIER, 1999) e o aumento da permeabilidade das brânquias, levando a alterações nos níveis plasmáticos dos íons (WENDELAAR BONGA, 1997).

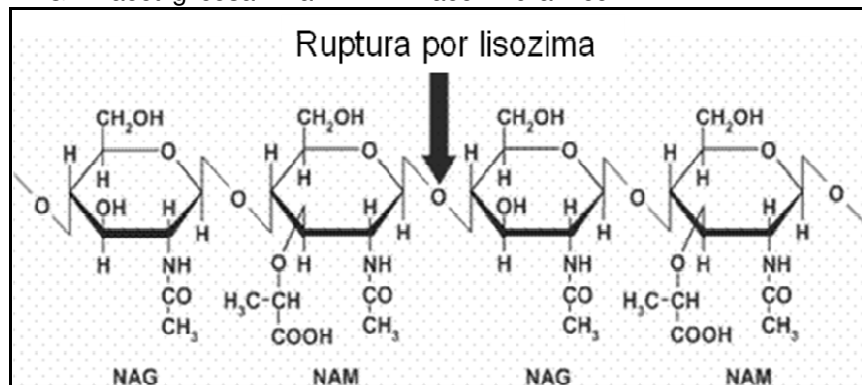
1.2. Sistema Imune em Peixes

Os peixes são os vertebrados mais primitivos. Possuem mecanismos não-específicos de defesa, como a fagocitose desenvolvida por macrófagos e leucócitos granulares, e são os primeiros animais a desenvolver resposta celular e humoral através de linfócitos (VERLHAC; GABAUDAN, 2000). Segundo Sakai

(1999), o sistema imunológico de peixes é basicamente semelhante ao descrito em mamíferos, porém, a imunidade inata (inespecífica), que não requer reconhecimento específico do antígeno e é considerada a primeira linha de defesa, representa uma parte considerável do sistema imune em peixes (VERLHAC; GABAUDAN, 2000). A pele e o muco representam um importante mecanismo de defesa não-específico já que previnem a invasão por microrganismo. No entanto, quando os microrganismos penetram nos tecidos uma resposta inflamatória não-específica é desencadeada. Os fagócitos (monócitos e macrófagos) e os neutrófilos são quimicamente atraídos ao local e imediatamente começam a fagocitar e destruir os microrganismos invasores. Há também a participação das células granulocíticas, como eosinófilos, célula granulocítica especial (CGE) e célula citotóxica, que se desgranulam liberando substâncias que matam as células infectadas por vírus ou os parasitas que são muito grandes para serem eliminados pelo processo de fagocitose. Estas células são auxiliadas por vários fatores imunológicos solúveis como as proteínas do sistema complemento e a lisozima (ALVAREZ-PELLITERO, 2008; VERLHAC; GABAUDAN, 2000).

A lisozima é uma muramidase capaz de quebrar as ligações glicosídicas β 1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina da parede celular de bactérias gram-positivas (Figura 2). Sabe-se ainda que a lisozima pode participar da opsonização e da ativação das proteínas do sistema complemento e de fagócitos (ALVAREZ-PELLITERO, 2008; SAURABH; SAHOO, 2008).

Figura 2. Ponto de ruptura da parede celular bacteriana pela lisozima. NAG=N-acetilglicosamina. NAM=N-acetilmurâmico.



(Fonte:

<http://www.unav.es/bioquimica/estructura/trabajos/Lisozima/frames/imag e002.gif>)

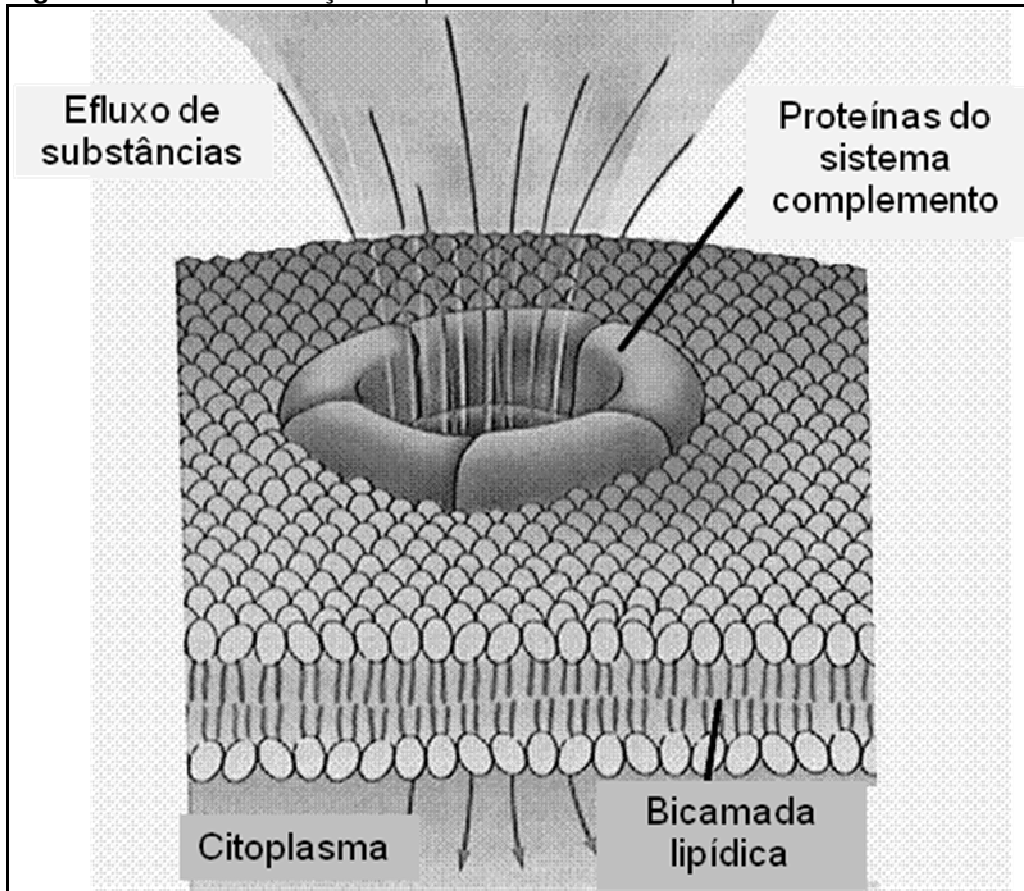
O sistema complemento, por sua vez, consiste em um grupo de componentes protéicos e não-protéicos que podem ser ativados pelo contato com certos polissacarídeos de parede celular microbiana (via alternativa e via das lectinas) ou pelo contato com anticorpos ligados ao antígeno (imunocomplexo - via clássica) (Figura 3). O sistema complemento realiza a lise da membrana celular de várias espécies de bactérias e de células do organismo que estejam infectadas (Figura 4). Além disso, alguns componentes liberados após a ativação do sistema complemento influenciam a migração dos fagócitos para o local da infecção (quimiotaxia), aumentando principalmente a resposta inflamatória aguda funcionando como anafilatoxinas (C3a e C5a), enquanto outros componentes cobrem as bactérias e facilitam sua aderência aos fagócitos (opsonização) (RUS et al., 2005; VERLHAC; GABAUDAN, 2000).

Figura 3. Vias de ativação das proteínas do sistema complemento.



(Fonte:<http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/chap2-1.gif>)

Figura 4. Mecanismo de ação das proteínas do sistema complemento.



(Fonte: <http://www.rbi.fmrp.usp.br/imunobiol/aulas/sv15215286.jpg>)

Muitas vezes, os mecanismos de defesa não-específicos não são suficientes para impedir a infecção, de forma que a doença se desenvolve acionando os mecanismos específicos de defesa que produzirão uma memória imunológica, podendo bloquear o desenvolvimento de uma nova infecção causada pelo mesmo patógeno. As células envolvidas nas respostas imunológicas específicas são os macrófagos que servem como células apresentadoras de antígenos e os linfócitos T e B, cujas funções seriam mediar a resposta imunológica e produzir anticorpos, respectivamente (WEDEMEYER, 1996).

Os principais tecidos linfóides nos peixes teleósteos são o rim anterior, o timo, o baço e os tecidos linfóides associados à mucosa (MALT), incluindo o trato digestório, a pele e as brânquias (PRESS; EVENSEN, 1999). O rim anterior é o principal órgão hematopoiético, mas funciona também como um órgão linfóide secundário, importante na indução e elaboração da resposta imune. O baço tem um importante papel na destruição dos eritrócitos, mas também atua como órgão linfóide secundário. Os MALT funcionam como uma barreira inicial à entrada de

patógenos. Se os patógenos conseguirem ultrapassar essa primeira barreira e alcançar a circulação, o rim anterior e o baço poderão realizar a retenção desses antígenos (PRESS; EVENSEN, 1999).

Muitos fatores podem influenciar a resposta imunológica nos peixes, tais como os ambientais, estressores, nutrientes e micronutrientes (PULSFORD et al., 1995; VERLHAC; GABAUDAN, 2000). Sendo os peixes animais heterotérmicos, seus processos fisiológicos são influenciados pela temperatura. Sabe-se que baixas temperaturas diminuem todos os processos fisiológicos e metabólicos, incluindo os imunológicos. Além disso, o funcionamento normal dos linfócitos nos peixes depende da fluidez dos lipídios das membranas, que, por sua vez, está intimamente associada à temperatura ambiental (VERLHAC; GABAUDAN, 2000). Já os estressores, como transporte, adensamento, manuseio e baixa qualidade de água, provocam a liberação de hormônios como os corticosteróides, que causam imunodepressão (HARRIS; BIRD, 2000). Ainda, alguns micronutrientes, como as vitaminas antioxidantes C e E, parecem possuir propriedades imunomodulatórias quando consumidas em quantidade adequada (VERLHAC; GABAUDAN, 2000). Dependendo do tipo, da quantidade e da duração da exposição a estes fatores, os efeitos sobre o animal podem ser negativos ou positivos (VERLHAC; GABAUDAN, 2000).

lida e Kurogi (2001) estudando estresse social em *Oreochromis niloticus*, observaram redução da atividade respiratória e fagocítica dos neutrófilos nos peixes subordinados. Ortuño e colaboradores (2002) encontraram diminuição na atividade do sistema complemento e redução da atividade respiratória de leucócitos em *Spaurus aurata* submetido a diversos fatores estressantes. Ainda nesta espécie, Tort e colaboradores (1996) relataram diminuição significativa dos níveis de linfócitos circulantes e na aglutinação após três semanas de adensamento, enquanto Rotllant e colaboradores (1997) observaram um estado de imunodepressão em *Pagrus pagrus* igualmente submetido ao estresse por adensamento. Já os efeitos benéficos podem ser observados utilizando-se moduladores que estimulam o sistema imunológico, destacando os imunoestimulantes.

As mudanças no sistema imune estão entre as mais relevantes, uma vez que podem favorecer o aparecimento de doenças que resultam na morte do animal (MAULE et al., 1989). A fim de monitorar o estado imune dos peixes sob condições estressantes de cultivo, as respostas imune inatas ou não-específicas têm

se apresentado como ferramentas valiosas, por serem efetivas contra uma ampla variedade de antígenos (ROTLLANT et al., 1997).

Dentre essas respostas, a concentração de lisozima é apropriada para testar a resposta a infecções potenciais. Sua distribuição entre os órgãos nos peixes (sangue, muco e tecido linfomielóide) sugere que ela tenha um importante papel na defesa antimicrobiana (ALVAREZ-PELLITERO, 2008; SAURABH; SAHOO, 2008). De maneira semelhante, a atividade do sistema complemento está envolvida no combate a fungos, bactérias e vírus e sua atividade é de 8 a 10 vezes maior em peixes do que em mamíferos (SAKAI, 1992; SUNYER; TORT, 1995). Além disso, a atividade da via alternativa do sistema complemento tem função em uma ampla faixa de temperatura, constituindo-se uma poderosa defesa natural em organismos heterotérmicos, como os peixes (SAKAI, 1983). E ainda, o número de linfócitos circulantes também tem sido muito estudado como indicador do estado imunológico devido ao seu importante papel em toda resposta imune e pelo fato de o estresse alterar várias vias fisiológicas do sistema imunológico (DHABHAR, 2009; MAULE; SCHRECK, 1990). Segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), para algumas espécies o estresse agudo pode causar mudanças significativas na contagem de leucócitos em razão da hemoconcentração ou da hemodiluição. Somado a isso, os autores destacam que diferenças na qualidade da água, especialmente temperatura, podem afetar os valores do leucograma. Além disso, Tripp e colaboradores (1987) determinaram que o estresse elevado pode inibir a liberação de interleucinas, as quais estão envolvidas na diferenciação e maturação de leucócitos e de seus precursores.

1.3. Imunoestimulantes

Segundo definição da FAO (2005), suplementos alimentares são substâncias com efeito nutricional ou fisiológico acrescentadas à dieta normal isoladamente ou em combinação, tais como vitaminas, sais minerais ou outras. Na piscicultura, temos o suplemento alimentar como um produto adicionado à ração, em pequenas quantidades e fornecido durante períodos estratégicos durante o ciclo de produção.

Na aquicultura os suplementos alimentares mais estudados compreendem os grupos das vitaminas e minerais, imunoestimulantes, prebióticos e

probióticos. As vitaminas e os minerais são classificados como imunonutrientes, por serem necessários em concentrações adequadas, como qualquer outro nutriente, para o bom funcionamento do sistema imune, pois estão envolvidos em diversas funções fisiológicas e imunológicas do organismo. Os imunonutrientes conferem benefícios ao animal por servirem como substrato ou fonte de energia para o sistema imune (GATLIN III et al., 2006). Por definição, imunoestimulante é uma substância química capaz de melhorar a resposta imune inata ou inespecífica por modular as funções efetoras das células do sistema imune na fase inicial de reconhecimento do patógeno (GALINDO-VILLEGA; HOSOKAWA, 2004). Portanto, o uso de imunoestimulantes pode induzir proteção contra doenças, por aumentar a atividade dos mecanismos de defesa inespecíficos em organismos aquáticos de criação (BRICKNELL; DALMO, 2005; SAKAI, 1999). Glucanos, quitina, lactoferrina, levamisole, vitaminas, hormônio de crescimento e prolactina, dentre outros, têm sido utilizados como imunoestimulantes, porém, para um uso efetivo deve-se levar em consideração o método de administração da substância, a dosagem adequada, o tempo de tratamento e as condições fisiológicas do peixe (SAKAI, 1999).

Dentre os três métodos principais de controle de doenças em peixes, vacinação, quimioterapia e uso de imunoestimulantes, este último tem se destacado por compensar as limitações da quimioterapia e da vacinação. Sabe-se que os imunoestimulantes são mais seguros que a quimioterapia e sua faixa de eficiência é mais ampla que a da vacinação. Por isso, o uso de imunoestimulantes tem sido apontado como uma importante medida profilática na aquicultura (SAKAI, 1999).

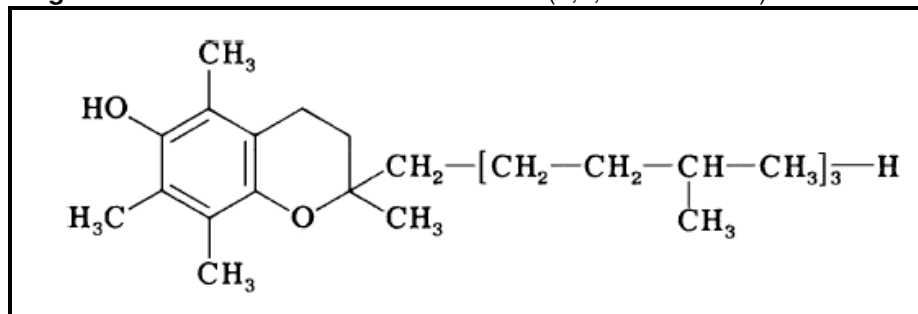
As vitaminas estão entre os nutrientes mais importantes por poderem favorecer melhor funcionamento do sistema imune. Uma das vitaminas mais estudadas em organismos aquáticos é a vitamina C. Vários efeitos da deficiência dessa vitamina em peixes têm sido descritos, tais como a redução da produção de anticorpos, da atividade do sistema complemento e da função macrofágica (HARDIE et al., 1991; LI; LOVELL, 1985; VERLHAC; GABAUDAN, 2000).

A vitamina C também parece ter um papel positivo na recuperação do estresse. Montero e colaboradores (1999) observaram que *Sparus aurata* mantido em alta densidade de estocagem apresentaram maior atividade de lisozima no soro se comparado ao mantido em baixa densidade. Entretanto, este efeito não era observado quando os animais da alta estocagem eram alimentados com ração suplementada com vitamina C e E. Verlhac e Gabaudan (1994) observaram maior

porcentagem de linfócitos em salmão do atlântico arraçoado com dietas suplementadas com vitamina C antes de serem submetidos ao estresse por temperatura baixa. Em outro estudo, Verlhac e colaboradores (1998) observaram os mesmos resultados em truta arco-íris, mostrando a importância dessa vitamina na manutenção do equilíbrio orgânico dos peixes.

A vitamina E, utilizada no presente trabalho como imunostimulante, é outro nutriente relacionado à eficiência do sistema imune, pois ela atua como um antioxidante lipossolúvel nas membranas biológicas (MONTERO et al., 1999). O termo vitamina E compreende um conjunto de compostos que engloba as atividades dos tocoferóis e dos tocotrienóis. O α -tocoferol é o composto que possui a maior atividade de vitamina E *in vivo* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993) e tem sido a forma de incorporação desta vitamina mais comumente usada. Sua fórmula química é $C_{29}H_{50}O_2$ e sua fórmula estrutural está apresentada na Figura 5.

Figura 5. Fórmula estrutural do α -Tocoferol (5,7,8-trimetiltocol).



(Fonte: HALVER, 2002.)

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel, termo lábil e fotossensível. Atua como antioxidante para manter a homeostase de metabólitos celulares e plasmáticos lábeis (HALVER, 2002). Essa vitamina atua com selênio e ácido ascórbico (vitamina C) nas enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase para evitar a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (LEHNINGER, 1977). Em sua capacidade antioxidante, a vitamina E está envolvida na manutenção da permeabilidade normal dos capilares e do músculo cardíaco, bem como das membranas biológicas, de modo geral (HALVER, 2002).

A deficiência desta vitamina pode ter como consequências a sobrevivência e o crescimento reduzidos, anemia, ascite, eritrócitos imaturos, tamanho variável dos eritrócitos, fragilidade eritrocítica, distrofia muscular nutricional, quantidade de água corporal elevada e susceptibilidade ao estresse de manejo

(HALVER, 2002). Já a hipervitaminose pode causar redução no crescimento, reação hepática tóxica e morte (HALVER, 2002).

Sabe-se que a deficiência de vitamina E reduz a função dos linfócitos B e T, a atividade macrofágica e a atividade do sistema complemento em algumas espécies de peixes (SAKAI, 1999). Sabe-se ainda que, para algumas espécies de peixes, a suplementação com vitamina E pode aumentar a atividade fagocítica dos leucócitos, a produção de ânions superóxidos e a atividade do sistema complemento (ORTUÑO et al., 2001; SAKAI, 1999). Entretanto, poucos estudos abordam a relação entre o estresse e a nutrição ou os possíveis efeitos produzidos pela interação entre a suplementação de alguns nutrientes na dieta e a variação de temperatura (agente estressor). Além disso, a maioria dos estudos realizados e disponíveis na literatura não se refere a espécies de peixes tropicais de água doce.

1.4. *Piaractus mesopotamicus*

O *Piaractus mesopotamicus*, popularmente conhecido como pacu, pertence à sub-família Serrasalminae, família Characidae, ordem Characiformes. Está amplamente distribuído na América do Sul, ocorrendo desde a bacia do Rio Orenoco, na Venezuela, até a bacia do Rio da Prata, no Uruguai (GODOY, 1975).

É uma espécie migratória capaz de percorrer grandes distâncias, em cardumes imensos, principalmente, durante o período de reprodução. O pacu tem hábito onívoro, alimentando-se de frutos, folhas e crustáceos, e eventualmente de pequenos peixes (URBINATI; GONÇALVES, 2005). No ambiente natural, o pacu não tem comportamento alimentar contínuo e seu ciclo de vida está estreitamente relacionado a períodos de alta ingestão de carboidratos, sofrendo flutuações de acordo com a disponibilidade do alimento, em consequência de variações ambientais e da migração reprodutiva (URBINATI; GONÇALVES, 2005).

O pacu possui corpo alto, discoidal, lateralmente comprimido, com escamas ventrais em forma de quilha serrilhada, formada por espinhos (SHIBATT; DIAS, 2006). Sua coloração é castanha escura, com ventre amarelo-dourado. Os jovens são prateados, com máculas escuras no flanco. As nadadeiras são escuras, a boca é terminal, com seis a oito dentes molariformes (SHIBATT; DIAS, 2006). Essa espécie pode crescer até mais de 50 centímetros e atingir até 20 kg (Figura 6).

Figura 6. Foto de exemplar de juvenil de pacu obtida em nosso laboratório.



Além da sua importância ecológica e social nas regiões de origem, o pacu apresenta grande interesse na piscicultura comercial tanto pela sua rusticidade no manejo, como pelo crescimento rápido, além de sua carne ser de ótima qualidade (URBINATI; GONÇALVES, 2005). É atualmente uma das espécies de peixes nativos mais amplamente cultivadas na região Neotropical e o seu potencial para a aquicultura tem sido reconhecido há algum tempo (JOMORI et al., 2003; URBINATI; GONÇALVES, 2005).

Entretanto, o cultivo dessa e de outras espécies passa por algumas situações desfavoráveis. Estas, normalmente referidas como situações estressantes, são muitas vezes encontradas tanto na aquicultura como na natureza. Os peixes estão sujeitos a inúmeras variações ambientais e, no caso dos cultivos, algumas práticas de manejo podem ser também, fontes potenciais de estresse. Choques de temperatura podem ocorrer por variações climáticas bruscas num curto período e, também, pela transferência abrupta de peixes entre tanques com água de temperaturas distintas (DONALDSON et al., 2008; INOUE, 2005).

Além disso, o cultivo de pacu também ocorre nas regiões sul e sudeste, que, além de apresentarem temperaturas mais baixas que outras regiões, estão sujeitas a quedas bruscas de temperatura (ESTEVES, 1988).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que os estressores em aquicultura são inevitáveis e sabendo-se dos grandes prejuízos que decorrem deste processo, torna-se necessário adotar algumas estratégias que atenuem seus efeitos nocivos nos peixes. O uso de rações suplementadas com níveis adequados de vitamina E em períodos que antecedem o manejo poderia ser uma destas estratégias, considerando-se o papel mitigador que este nutriente parece exercer no estresse. Muitos estudos são necessários para se conhecer as exigências das diferentes espécies nativas e o efeito desta vitamina na atenuação das respostas ao estresse nas diversas situações encontradas no cultivo de peixes.

Assim, os objetivos que nortearam este trabalho se referem ao estudo dos ajustes metabólicos e imunológicos de pacu, alimentado com diferentes concentrações de vitamina E, frente à situação de estresse térmico circadiano, dada a importância comercial desta espécie na piscicultura nacional e à ocorrência rotineira dessa situação estressante, além da carência de estudos com tal abordagem em espécies tropicais de água doce.

3. OBJETIVO

Admitindo-se os efeitos bioquímico-metabólicos da vitamina E e sua atividade biológica nos processos imunológicos, propusemos neste trabalho avaliar os efeitos desta suplementação vitamínica no metabolismo intermediário e na resposta imune inata de *Piaractus mesopotamicus* submetido à oscilações ambientais de temperatura como agente estressor.

Estratégias de ação:

- Mensuração dos principais indicadores plasmáticos de resposta ao estresse (cortisol, glicose, lactato, amônia e íons);
- Determinação das reservas de glicogênio hepático e muscular;
- Avaliação diferencial do número de leucócitos no sangue periférico;
- Determinação da concentração de lisozima sérica;
- Determinação da atividade hemolítica do sistema complemento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), fornecidos pela piscicultura São Geraldo (Sertãozinho, SP), foram transportados para o Laboratório de Bioquímica Adaptativa (DGE-UFSCar), onde permaneceram estocados em tanques externos de 2000L. Nesses tanques, a água foi filtrada e mantida a 27°C, com aeração constante e fluxo contínuo em sistema fechado. Os animais permaneceram nestas condições por cerca de 60 dias para aclimação e crescimento até atingirem o tamanho desejado para os experimentos. Neste período, os animais receberam alimento comercial da marca Guabi (35% de proteína), duas vezes ao dia, até a saciedade. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos, sob protocolo nº 003/2010.

4.1. Dietas experimentais

O tratamento prescrito como protocolo experimental foi realizado utilizando-se suplementação de vitamina E. Para isso, foram elaboradas três dietas experimentais que continham aproximadamente 4100 kcal de energia bruta/kg de ração, sendo 7% de lipídeos totais (LT) e 46% de extrativo não-nitrogenado (ENN), 27% de proteína bruta e níveis diferentes de vitamina E (0, 100 e 300 mg/kg de ração) (Tabela 2). As dietas experimentais foram confeccionadas no próprio laboratório através do processo de extrusão com umidade de 10%. As dietas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, por 6 horas a 55°C e resfriadas à temperatura ambiente.

A adição da vitamina E foi feita após a secagem das rações, dado que tal vitamina é termolábil. A vitamina E foi primeiramente diluída em óleo de soja, seguindo-se as proporções adequadas, e posteriormente, adicionada à ração manualmente. Este procedimento foi realizado semanalmente e as rações foram estocadas em recipientes plásticos escuros à -20°C até a sua utilização, a fim de minimizar a degradação da vitamina.

A análise bromatológica das rações foi feita pelo Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus Jaboticabal, sob coordenação da Profa. Dra. Telma T. Berchielli. A quantificação de vitamina E na ração foi feita pela pós-graduanda Marília Almeida Trapp no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos do

Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho.

Tabela 2. Formulação base e composição dos nutrientes das dietas experimentais utilizadas no experimento.

Ingrediente	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Milho (%)	34,5	34,5	34,5
Farelo de trigo (%)	12,0	12,0	12,0
Farelo de arroz (%)	10,5	10,5	10,5
Farelo de soja (%)	22,0	22,0	22,0
Farinha de peixe (%)	18,0	18,0	18,0
Óleo de soja ¹ (%)	2,5	2,5	2,5
Suplemento Vitamínico e Mineral ² (%)	0,5	0,5	0,5
Vitamina E (mg/Kg)	0	100	300
TOTAL (%)	100	100	100
Composição analisada			
Matéria seca (%)	88,14	87,63	88,09
Proteína bruta (%)	27,23	27,44	26,42
Lipídeos (%)	6,67	7,29	6,36
Fibra bruta (%)	2,03	1,92	3,40
ENN (%)	46,85	45,54	46,49
Minerais (%)	5,36	5,44	5,42
Energia bruta (kcal/g)	4184,31	4181,94	4210,76
Vitamina E (mg/Kg)	<0,005	101	290

¹A vitamina E foi diluída ao óleo, adicionados após a extrusão;

²sem vitamina E; ingrediente/kg de suplemento. Vitaminas: A=160.0000 UI; D3= 30.0000 UI; K3= 1.000 mg; B12= 5 mg; B1= 1.600 mg; B2= 2.000 mg; B6= 1.600 mg; Biotina= 200 mg; Ácido Fólico = 800 mg; Ácido Pantotênico = 31.500 mg; Niacina = 14.000 mg; Colina = 120 mg; C= 40.000 mg; Ferro= 30.000 mg; Cobre= 600 mg; Manganês= 2.600 mg; Iodo= 220 mg; Selênio= 60 mg; Zinco= 6.000 mg. Nova América – Produtos Agropecuários LTDA, Brasil. Foi utilizado 0,005g de premix por kg de ração.

4.2. Desenho Experimental

Após a aclimação, duzentos e vinte e oito exemplares de pacu foram transferidos dos tanques de 2000L para doze tanques de amianto de 250L e distribuídos igualmente (dezenove peixes por tanque). Nos tanques experimentais a qualidade da água foi monitorada e os parâmetros mantidos em: temperatura 27°C, pH 7,0, oxigênio dissolvido 5,7 mg/L, condutividade 74,5 µS e amônia [NH₄⁺] inferior a 1 mg/L. Os animais ainda receberam o mesmo alimento comercial da fase de aclimação, duas vezes ao dia, até a saciedade. Após 30 dias, neste novo ambiente, foi dado início ao experimento, sendo amostrado um peixe de cada tanque para verificação das condições biológicas iniciais (grupo controle – dados não mostrados). Cada tanque equivalia a uma unidade experimental.

Durante o experimento foram utilizadas 3 dietas diferentes com relação às concentrações de vitamina E: 0; 100; e 300 mg/kg de ração. Dos doze tanques, quatro receberam a dieta com 0 mg/kg de ração, outros quatro receberam a dieta com 100 mg/kg de ração e os demais receberam a dieta com 300 mg/kg de ração. A escolha dos tanques foi aleatória. Os animais eram alimentados até a saciedade e a quantidade de ração consumida foi determinada para fins de cálculo dos parâmetros zootécnicos.

Após 45 dias, dois animais de cada tanque foram amostrados, totalizando 8 peixes por tratamento (n=8). Estes animais constituíram os grupos controle 0h - 0 mg (C0h-0mg), controle 0h - 100 mg (C0h-100mg) e controle 0h - 300 mg (C0h-300mg) de acordo com a dieta recebida por cada um. Logo após, oito peixes dos dezesseis restantes em cada caixa foram transferidos para tanques de amianto de 250L sem controle de temperatura, de forma que a temperatura da água desses tanques variasse naturalmente conforme o ambiente (grupos experimentais 24h e grupos experimentais 72h). Nesses novos tanques, os demais parâmetros de qualidade de água (pH, oxigênio dissolvido, condutividade, dureza, alcalinidade e amônia) continuaram sendo monitorados. Os demais peixes permaneceram nas condições iniciais, ou seja, sob temperatura de água controlada, porém foram também manuseados (controle de manuseio: grupos controle 24h e grupos controle 72h). Os peixes foram mantidos nessas condições por três dias. Nesse período a alimentação foi suspensa e foram feitas duas coletas: uma após 24 horas (controle de manuseio: C24h-0mg, C24h-100mg, C24h-300mg; experimentais: E24h-0mg, E24h-100mg, E24h-300mg) e outra após 72 horas (controle de manuseio: C72h-0mg, C72h-100mg, C72h-300mg; experimentais: E72h-0mg, E72h-100mg, E72h-300mg). Em cada coleta foram amostrados dois peixes de cada caixa. O experimento foi realizado no inverno, sendo que a temperatura nos tanques do grupo experimental atingiu a mínima de 19°C, durante a noite, e a máxima de 26°C, durante o dia.

Os animais amostrados foram anestesiados com eugenol (1:20) (INOUE et al., 2003) e, logo em seguida, foi feita a coleta de sangue. Para hematologia e análises plasmáticas, o sangue foi coletado por punção caudal com seringas plásticas de 3 mL heparinizadas. O plasma foi obtido por centrifugação a 13400 x g por 3 minutos e estocado a -80°C para posteriores determinações de cortisol, glicose, lactato, amônia, proteína, aminoácidos e íons (sódio, potássio e

cloreto). Para as extensões sanguíneas e análises sorológicas o sangue foi coletado com seringas não heparinizadas. O soro foi separado por centrifugação a 600 x g por 15 minutos e estocado a -80°C para determinação de atividade do sistema complemento e de lisozima até o momento do uso. Logo após a coleta do sangue, os peixes foram rapidamente abatidos por secção medular para coleta de fígado e músculo branco, os quais foram estocados a -80°C para posterior quantificação de glicogênio. Antes da coleta dos tecidos os animais foram pesados e medidos para a avaliação do crescimento.

4.3. Parâmetros zootécnicos

Os parâmetros de desempenho foram calculados de acordo com as fórmulas descritas a seguir: a) Ganho em peso diário (GPD) em g/dia: peso final- peso inicial/tempo (dias); b) Ganho em comprimento diário (GCD): comprimento total final – comprimento total inicial/tempo; c) Consumo diário (CD): consumo total/tempo; d) Conversão alimentar (CA): consumo total de alimento/ganho em peso diário; e) Taxa de crescimento específico (TCE): $(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial} / \text{ tempo (dias)}) \times 100$; f) Taxa de eficiência protéica (TEP): ganho em peso vivo/proteína bruta consumida.

4.4. Hematimetria

Hematócrito

A porcentagem de células vermelhas foi determinada por centrifugação em capilares de vidro para micro-hematócrito. Tubos capilares contendo sangue transferido de seringas heparinizadas foram fechados em uma das extremidades com massa de modelar e colocados em centrífuga de micro-hematócrito por 3 minutos a 13400 x g. Os valores de hematócrito foram lidos em cartão de leituras de hematócrito da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Os valores de hematócrito foram expressos em porcentagem.

Hemoglobina

A concentração de hemoglobina total foi determinada pela formação da cianometahemoglobina (DRABKIN, 1948). Foram utilizados 10µL de sangue total de cada amostra, diluídos em 2mL de solução de Drabkin, seguida de homogeneização e leitura em espectrofotômetro a 540nm. O cálculo da concentração de hemoglobina total foi feito pela fórmula:

$$\text{Hb total (g/dL)} = \text{DO 540 nm} \times 1,6114 \times 200/11$$

Contagem de eritrócitos (GV, glóbulos vermelhos)

Alíquotas de sangue (10µL) foram misturadas em 2mL de solução de citrato-formol e agitadas para contagem do número de células vermelhas. Foram utilizados 10 µL desta mistura para a contagem em microscópio óptico, em câmara de Neubauer (LIMA et al., 1969).

Volume corpuscular médio (VCM)

Para o cálculo de VCM foram utilizados os valores de hematócrito e GV (LIMA et al., 1969), segundo a expressão:

$$\text{VCM (fL)} = [\text{hematócrito (L/L)} \times 1000] / \text{GV (milhões/mm}^3\text{)}$$

Hemoglobina corpuscular média (HCM)

Para o cálculo de HCM foram utilizados os valores de hemoglobina total e GV (LIMA et al., 1969), segundo a expressão:

$$\text{HCM (pg/célula)} = [\text{Hb total (g/dL)} / \text{GV (milhões/mm}^3\text{)}] \times 10$$

Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Para o cálculo CHCM foram utilizados os valores de hemoglobina total e de hematócrito (LIMA et al., 1969), segundo a expressão:

$$\text{CHCM (g/dL)} = \text{Hb total (g/dL)} / \text{hematócrito (L/L)}$$

4.5 Determinação dos intermediários metabólicos

Para as determinações de amônia, lactato e piruvato, amostras de plasma (100µL) foram desproteinizadas em 1 mL de ácido tricloro acético (TCA) 20% e centrifugadas a 13400 x g por 3 minutos.

Quantificação de Amônia

A amônia plasmática foi quantificada por nesslerização (modificado de GENTZKOW; MASEN, 1942). Em uma alíquota de 400µL de plasma desproteinizado era adicionada água até atingir 2 mL de solução, seguida de reativo de Nessler. A leitura óptica foi realizada em espectrofotômetro “Hach DR/2010” em 420 nm e a concentração foi estimada contra padrões de amônia contendo 100 nmols de NH₄Cl.

Quantificação de Lactato

A determinação da concentração de lactato total foi feita de acordo o método de Harrower e Brown (1972). Era utilizada uma alíquota de 50µL plasma desproteinizado à qual eram adicionados sulfato de cobre 4% e ácido sulfúrico com agitação lenta. Em seguida, era adicionado *p*-fenilfenol 1,5% em NaOH 0,5N, com agitação vigorosa e após 60 minutos os tubos eram incubados em banho-maria a 100°C. Após o resfriamento das amostras a leitura foi efetuada em espectrofotômetro “Hach DR/2010”, em 570nm, contra uma solução padrão de 100 nmols de lactato.

Quantificação de Piruvato

A concentração de piruvato foi estimada nos extratos ácidos segundo método de Lu (1939). Um volume adequado de extrato era adicionado a 250µL de dinitrofenilhidrazina 0,1% em HCl 2N. Após 30 minutos de repouso a 37°C, era adicionado à mistura de reação 3mL de NaOH 1,3N. A concentração de piruvato foi determinada em 440nm contra um padrão de 100nmols.

Quantificação de Glicose

A quantificação de glicose foi realizada pelo método da glicose oxidase (TRINDER, 1969), que tem por princípio a catálise oxidativa da glicose e produção de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com 4-amino-antipirina e fenol sob a ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma uma antipirilquinonímia de cor vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose na amostra. Os ensaios foram feitos com 10µL de plasma em cada poço de uma microplaca e a leitura das

amostras foi feita em uma leitora de microplaca (Molecular Devices) com filtro de 525nm contra uma curva padrão de glicose (0, 25, 50, 100 e 200 mg/dL). Os cálculos de concentração em mg/dL foram feitos no software Softmax Pro.

Quantificação de Proteína

O teor de proteína plasmática total foi determinado pelo método de Bradford (KRUGER, 1994) e a leitura das amostras foi feita em leitora de microplaca (Molecular Devices), acoplada ao software Softmax Pro, em 620nm. O plasma foi diluído 200 vezes e, dessa diluição, foram utilizados 10 μ L para análise. A diluição do plasma e a quantidade utilizada em cada poço da microplaca foram previamente determinadas. No método de Bradford utiliza-se como reagente o reativo de Bradford (KRUGER, 1994) e a concentração de proteína é estimada contra uma solução padrão de albumina 1 mg/mL.

Quantificação de Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺)

As concentrações totais de sódio e potássio plasmáticos foram determinadas em fotômetro de chama Digimed, modelo DM-61, cuja solução padrão contém 140 mEq Na⁺ e 5.0 mEq K⁺ (ref. DM-S 13A). As amostras de plasma para análise foram diluídas em água destilada na proporção de 1:100.

Quantificação de Cloreto (Cl)

As concentrações de cloreto foram determinadas segundo APHA (1980). O plasma foi diluído em água destilada na proporção de 1:100. Esse método utiliza como reagentes as soluções de tiocianato de mercúrio 0,09% em etanol P.A. (reagente A) e nitrato de ferro monohidratado 6% em ácido nítrico 0,4 M (reagente B), numa relação de 3A:10B. Uma curva feita com alíquotas de solução padrão NaCl 1 mM, foi usada como referência. As leituras ópticas foram realizadas em 480 nm.

Quantificação de Aminoácidos livres

Na determinação de aminoácidos livres, uma alíquota de 20 μ L plasma total foi adicionada a 0,1% de ninhidrina em propanol. A mistura foi então colocada em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Após este período, a leitura óptica foi realizada em 570nm, contra um padrão de ácido aminoacético 1mM (COPLEY, 1941).

Quantificação de Glicogênio

A extração do glicogênio tecidual foi realizada segundo Bidinotto e colaboradores (1997). Esse método consiste na separação alcoólica do glicogênio após a hidrólise alcalina total do tecido em hidróxido de potássio 6N. Em seguida, foi feita a determinação direta de açúcares redutores totais no precipitado alcoólico (glicogênio) ressuspenso em água. Na determinação de açúcares redutores totais utiliza-se fenol 4,1% e ácido sulfúrico concentrado (DUBOIS, 1956). Foram utilizados para as análises 50 mg de fígado e 100 mg de músculo branco por mL de KOH 6N. A leitura óptica foi realizada em espectrofotômetro “Hach DR/2010” em um comprimento de onda de 480nm, contra um padrão de glicose 0,02%. O conteúdo de glicogênio foi expresso em μmols de glicosil-glicose/mg de tecido.

Quantificação de Cortisol

As determinações de cortisol plasmático foram realizadas por radioimunoensaio em contador de partículas beta no Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Profa. Dra. Margaret de Castro.

4.6. Avaliação da resposta imune inata

Contagem de leucócitos diferenciais

A contagem diferencial de leucócitos foi feita nos esfregaços sanguíneos corados com corante de Rosenfeld (FACCIOLI et al., 1996). Em cada lâmina foram contadas 100 células, utilizando-se microscopia de luz com aumento final de 1000 X.

Quantificação de lisozima sérica

O nível de lisozima sérica foi determinado por ensaio turbidimétrico de acordo com Ellis (1990) e Abreu e colaboradores (2009) usando lisozima de ovo de galinha (L6876, Sigma) (1mg/mL) como padrão. Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (M3770, Sigma) (0,2 mg/ mL tampão fosfato 0,05M pH 6,2) foi utilizada.

A solução de lisozima utilizada (1ng/ μ L) foi obtida diluindo-se cem vezes a solução estoque em tampão fosfato (NaH_2PO_4 ; 0,05M; pH 6,2). As amostras de soro foram previamente aquecidas em banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativação das proteínas do sistema complemento e para garantir que a lise do *M. lysodeikticus* fosse devida exclusivamente à ação da lisozima. O método foi adaptado para leitura em microplaca. O volume de soro utilizado para o ensaio foi 10 μ L, sendo completado com tampão fosfato para um volume final de 150 μ L. As amostras foram incubadas na leitora de placas (Molecular Devices) a 25°C por 2 minutos e, posteriormente, 150 μ L da suspensão de *M. lysodeikticus* (0,2 mg/mL) foram adicionados para completar um volume final de reação de 300 μ L em cada poço da microplaca. O branco foi preparado utilizando-se somente tampão fosfato (300 μ L). A diferença entre a turbidez inicial e final (variação de densidade óptica – Δ DO) foi mensurada entre 0 e 10 minutos em 450nm a 25°C. Os resultados foram expressos utilizando-se os valores da variação de densidade óptica para cada volume de amostra *versus* volume de lisozima da curva padrão. A equação de regressão linear da curva padrão de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima sérica (μ g/mL).

Avaliação do sistema complemento: Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada de acordo com a metodologia descrita previamente por Ferriani et al. (1990) e modificada para soro de pacu baseando-se em método descrito por Biller (2008). No ensaio foi utilizada uma suspensão de eritrócitos de coelhos, cuja preparação foi feita utilizando-se uma alíquota de sangue total de coelhos misturada a um mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante foi filtrada em gaze estéril para a retirada de material suspenso. À solução filtrada foi adicionado o mesmo volume do agente quelante TEA-EDTA (trietanolamina – ácido etileno diaminotetracético) 10mM, pH 7,4 e gelatina a 0,1%. Esta solução foi incubada por 15 minutos, a 37°C e, posteriormente, centrifugada a 600 x g, por 10 minutos, a 4°C, para preparação dos eritrócitos. Os eritrócitos foram, então, ressuspensos em tampão trietanolamina (TEA) – Mg^{2+} 2mM, pH 7,4 e lavados com o mesmo tampão por 3 vezes após centrifugação (600 x g, por 10 minutos, a 4°C). Os eritrócitos depois da última centrifugação foram ressuspensos em solução de Alséver e armazenados a 10°C, permanecendo viáveis por até 15 dias. No momento

da utilização, parte da suspensão de eritrócitos armazenada foi lavada duas vezes com tampão TEA- ácido etileno glicoltetracético (EGTA) 8mM e Mg^{2+} 2mM, com gelatina 0,1% (600 x g, por 10 minutos, a 4°C) e ressuspensos em tampão TEA-EGTA 1%, em densidade óptica entre 0,7 e 0,8 a 700nm. A padronização da metodologia para soro de pacu foi realizada em diversas diluições em tampão TEA-EGTA 8mM e Mg^{2+} 2mM, com gelatina 0,1%. A análise da atividade hemolítica do complemento foi realizada pela mistura de 400 μ L de cada diluição de soro com 800 μ L da suspensão de eritrócitos, a qual foi submetida à leitura da absorbância em 700nm, por 10 minutos, em espectrofotômetro provido de banho a 37°C (Hitachi U-2910). Após a padronização da diluição do soro a ser utilizada, 120 μ L de soro dos peixes de todos os tratamentos, na diluição de 1:10, foram adicionados a 280 μ L de tampão TEA-EGTA 8mM e Mg^{2+} 2mM, com gelatina 0,1% e a essa mistura foram acrescentados 800 μ L da suspensão de eritrócitos. A solução foi, então, submetida à leitura em espectrofotômetro, como descrito. Uma alíquota de soro foi aquecida a 56°C, por 30 minutos para controle negativo da atividade do sistema complemento. A diferença entre a absorbância inicial e final foi mensurada entre 0 e 10 minutos a 37°C. Os resultados foram expressos utilizando-se os valores da variação de absorbância.

4.7. Delineamento e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema multifatorial (2 condições x 3 dietas x 3 períodos), constituído de duas condições de temperatura (controlada e variável), três níveis de vitamina E na dieta (0, 100 e 300 mg/kg) e três períodos de coletas 0, 24 e 72 horas. Foram realizados os pré-testes de homogeneidade (Teste Levenes), seguidos pela análise de variância (One-way ANOVA). Quando diferentes as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). O programa SAS v.8.0 (SAS, 2001) foi empregado na análise estatística dos dados. Os gráficos foram gerados por meio do software Origin 5.0, baseados nas médias e desvios-padrão.

5. RESULTADOS

O presente estudo avaliou diferentes parâmetros fisiológicos e imunológicos antes e após a alimentação dos animais com dieta suplementada com diferentes concentrações de vitamina E. Durante o experimento não foi observada mortalidade de peixes. No início do experimento os animais possuíam média de peso de 63,8g ($\pm 9,9$ g) e média de comprimento de 13,6cm ($\pm 0,7$ cm). Ao final da fase experimental as médias observadas foram de 144,2g ($\pm 29,1$ g) e de 17,4cm ($\pm 1,6$ cm).

5.1. Variáveis de desempenho

Não foi observada diferença significativa entre os animais alimentados por 45 dias com diferentes níveis de vitamina E para nenhuma das variáveis de desempenho analisadas (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E por 45 dias.

Variável	Teores de Vitamina E		
	0 mg	100 mg	300 mg
GPD	1,07 \pm 0,17	1,36 \pm 0,48	1,17 \pm 0,08
GCD	0,09 \pm 0,01	0,1 \pm 0,03	0,09 \pm 0,01
CD	34,93 \pm 1,54	36,98 \pm 3,97	34,76 \pm 0,42
CA	0,76 \pm 0,11	0,67 \pm 0,2	0,68 \pm 0,04
TCE	1,27 \pm 0,16	1,37 \pm 0,37	1,38 \pm 0,25
TEP	0,11 \pm 0,02	0,13 \pm 0,04	0,12 \pm 0,01

n= 19; média \pm desvio padrão. GPD= ganho em peso diário (g/dia); GCD= ganho em comprimento diário (cm/dia); CD= consumo diário (g); CA= conversão alimentar; TCE= taxa crescimento específico; TEP= taxa de eficiência protéica.

5.2. Variáveis hematológicas

Hematócrito

No grupo controle o valor médio de hematócrito observado foi de 21,95% ($\pm 2,38\%$). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores de hematócrito significativamente maiores em relação ao grupo controle, porém não diferiram entre si (Figura 7). Houve um aumento significativo dos valores de hematócrito nos grupos C24h-0mg, E24h-0mg e C72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 8 e 9). Entretanto, nos animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, apenas o grupo C72h apresentou valores aumentados de hematócrito em relação ao grupo C0h (Figura 8). Valores aumentados de hematócrito também foram observados nos grupos E24-300mg, C72h-300mg e E72h-300mg, comparados ao C0h-300mg (Figuras 8 e 9). Comparando-se os grupos experimentais 24h entre si, observamos o menor valor de hematócrito nos animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figura 7). Já a comparação dos grupos experimentais 72h entre si, o maior valor de hematócrito foi observado nos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 7). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 10). Já os grupos C72h e E72h diferiram entre si nos animais alimentados com dieta sem suplementação (0 mg de vitamina E) e com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figura 10).

Figura 7. Hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

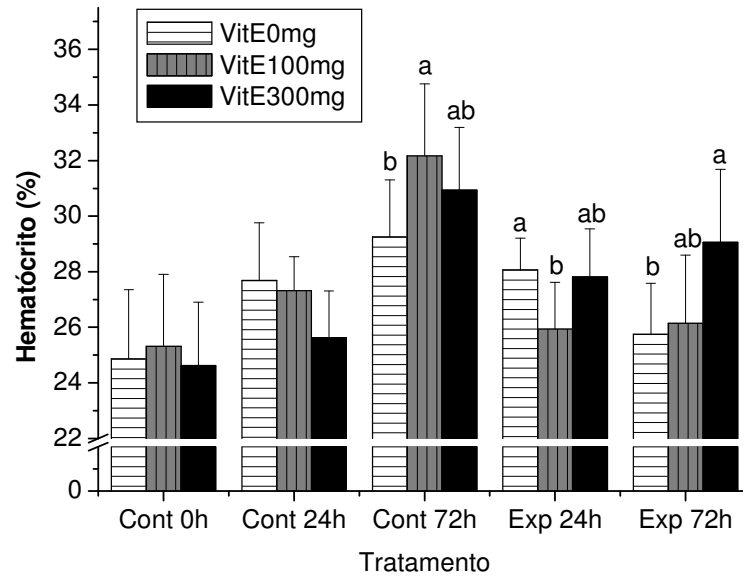


Figura 8. Hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

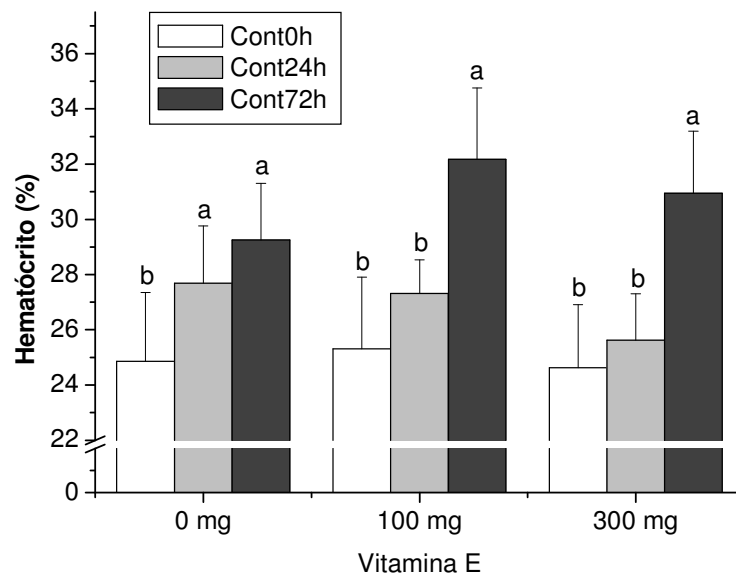


Figura 9. Hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

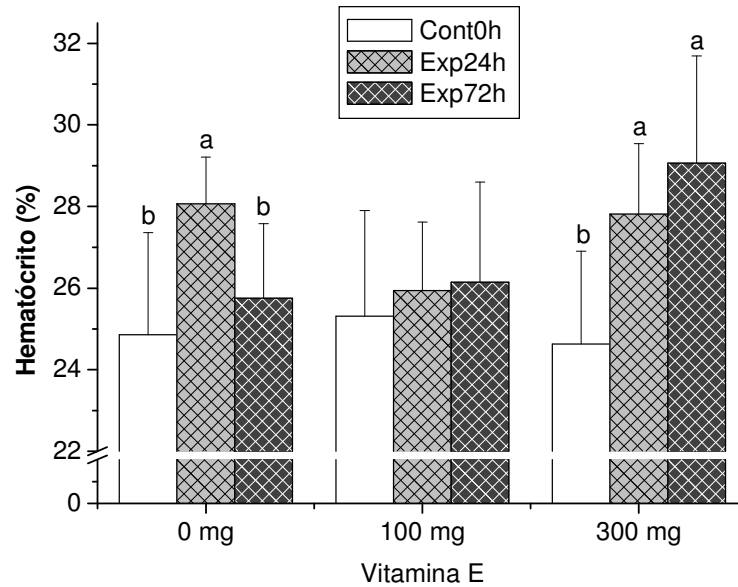
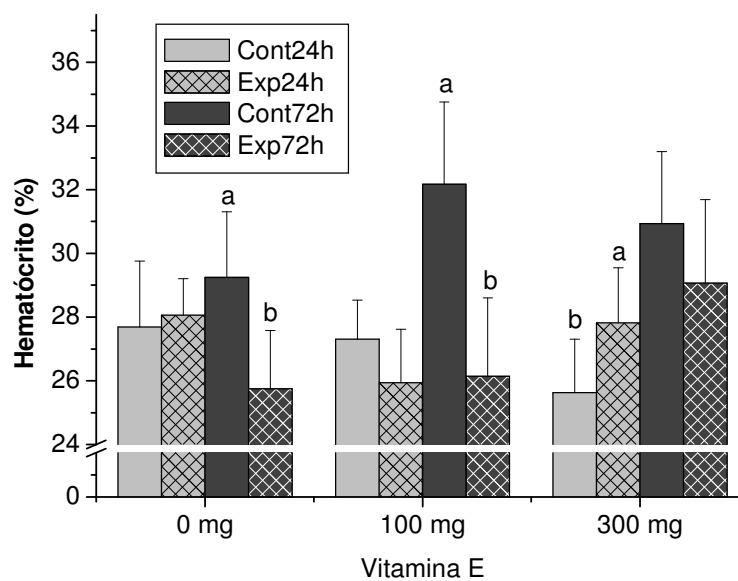


Figura 10. Hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Hemoglobina

O valor médio de hemoglobina no grupo controle foi 7,42 g/dL ($\pm 0,93$ g/dL). Este não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg, que também não diferiram entre si (Figura 11). Os valores de hemoglobina apresentaram-se aumentados no grupo E24h-0mg e diminuídos nos grupos C72h-0mg e E72h-0mg, comparados ao C0h-0mg (Figuras 12 e 13). Nos grupos de animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E houve aumento nos valores de hemoglobina nos grupos C24h e E24h em relação ao grupo C0h (Figuras 12 e 13). Já para os animais alimentados com a dieta suplementada com 300 mg de vitamina E, apenas o grupo E24h apresentou valor aumentado de hemoglobina, comparado ao grupo C0h (Figuras 12 e 13). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 11). O mesmo foi observado para os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E. Porém, em todas as três dietas os grupos E24h e E72h diferiram entre si, assim como os grupos C24h e C72h (Figuras 12 e 13). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C24h e E24h não diferiram entre si, bem como os grupos C72h e E72h (Figura 14).

Figura 11. Hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.

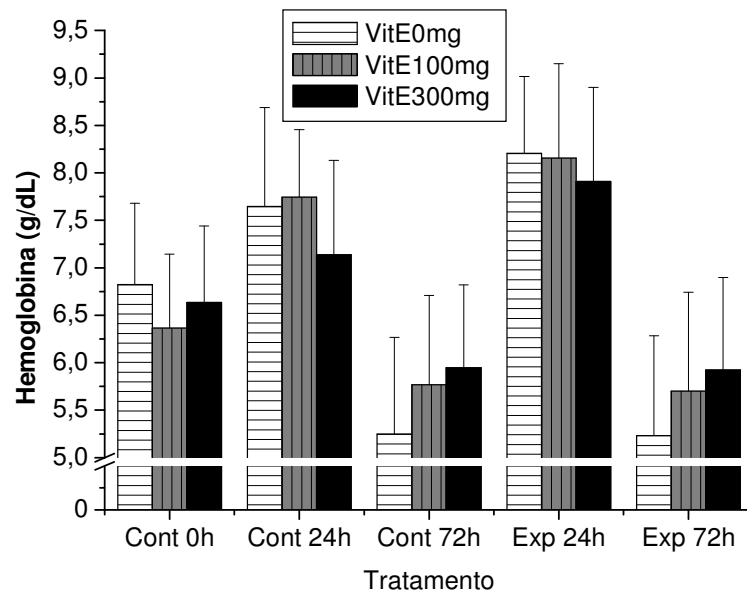


Figura 12. Hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

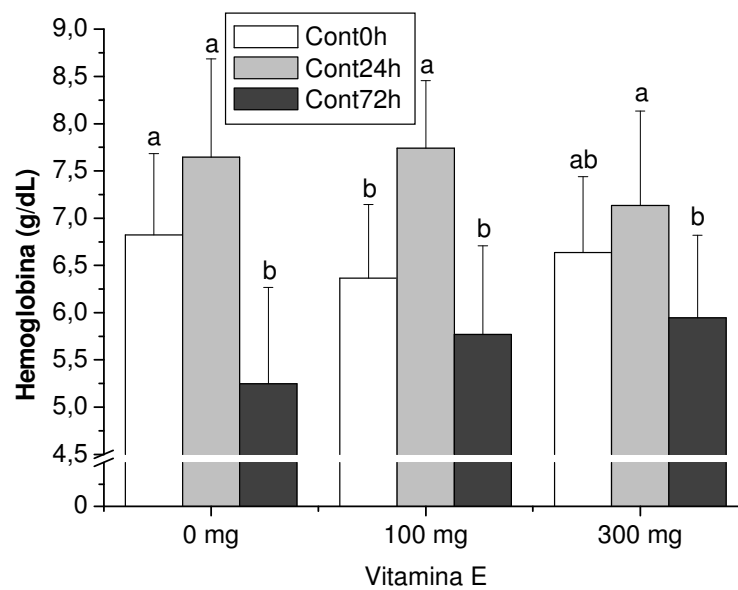


Figura 13. Hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

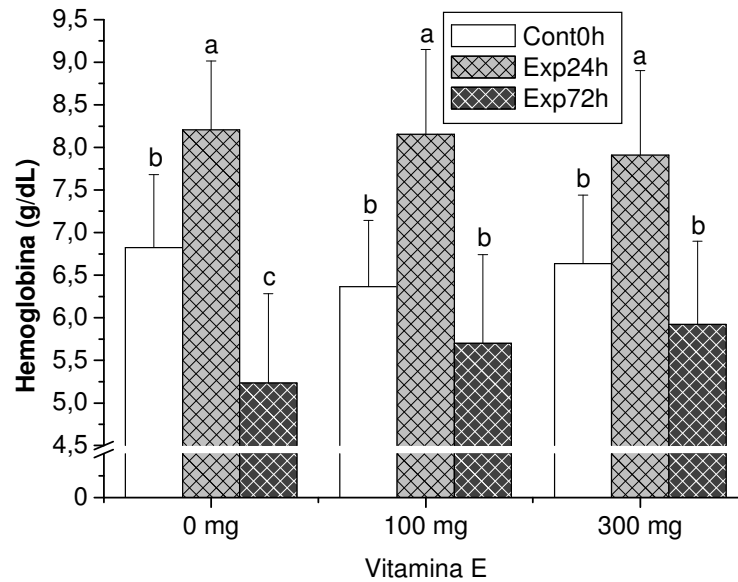
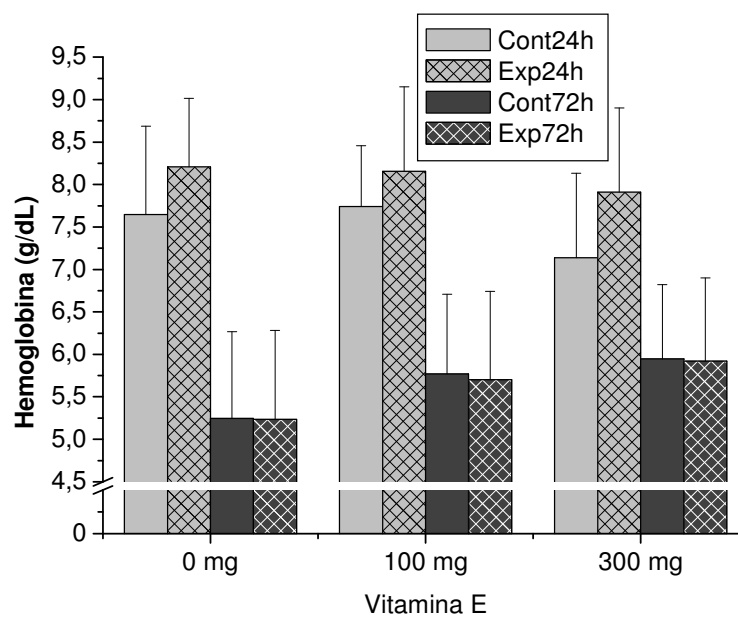


Figura 14. Hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E.



Glóbulos vermelhos (GV)

O grupo controle apresentou $1,40 \times 10^6$ células/mm³ ($\pm 0,13 \times 10^6$ células/mm³), valor este que não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg, que também não diferiram entre si (Figura 15). Houve aumento significativo no número de eritrócitos nos grupos E24h-0mg e E72h-0mg e redução no grupo C72h-0mg, comparados ao C0h-0mg (Figuras 16 e 17). Nos grupos de animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E houve aumento no número de glóbulos vermelhos nos grupos E24h, C72h e E72h em relação ao grupo C0h (Figuras 16 e 17). Já nos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E foi observado um aumento no número de células vermelhas apenas nos grupos E24h e E72h em relação ao grupo C0h (Figura 17). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-100mg apresentou o menor número de eritrócitos (Figura 15). Já os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E não diferiram entre si. Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C24h e E24h diferiram entre si (Figura 18). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 18).

Figura 15. Glóbulos vermelhos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

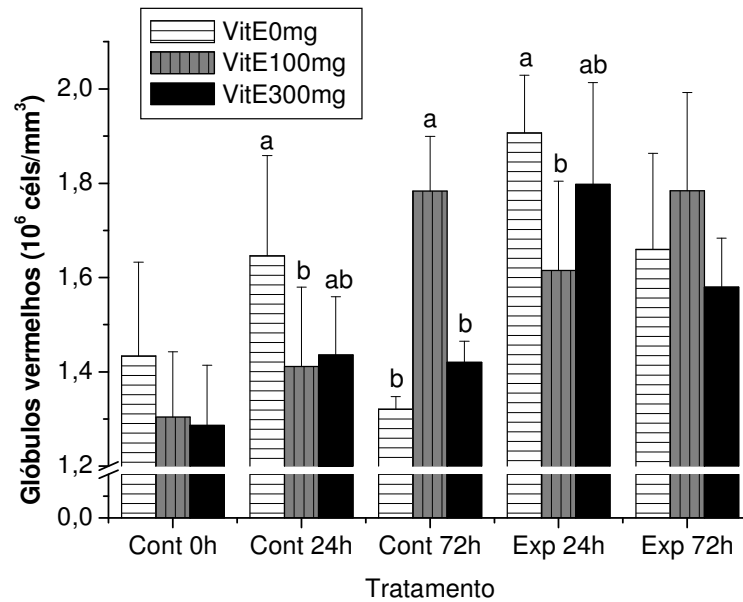


Figura 16. Glóbulos vermelhos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

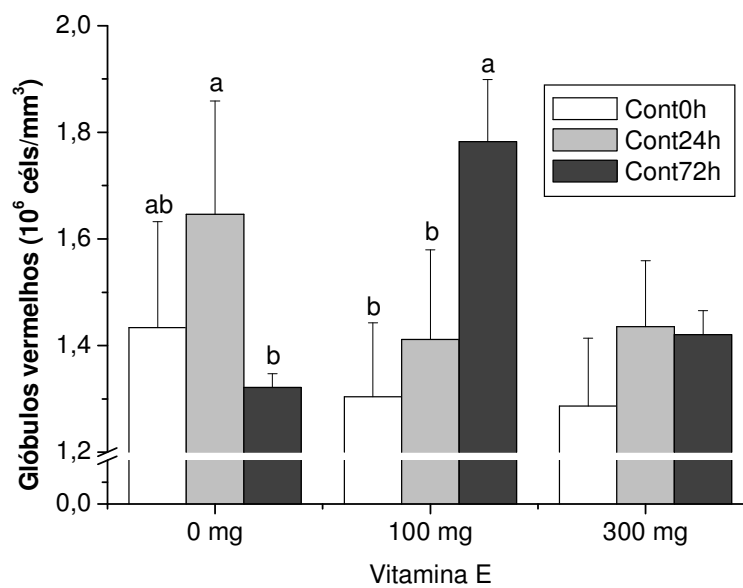


Figura 17. Glóbulos vermelhos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

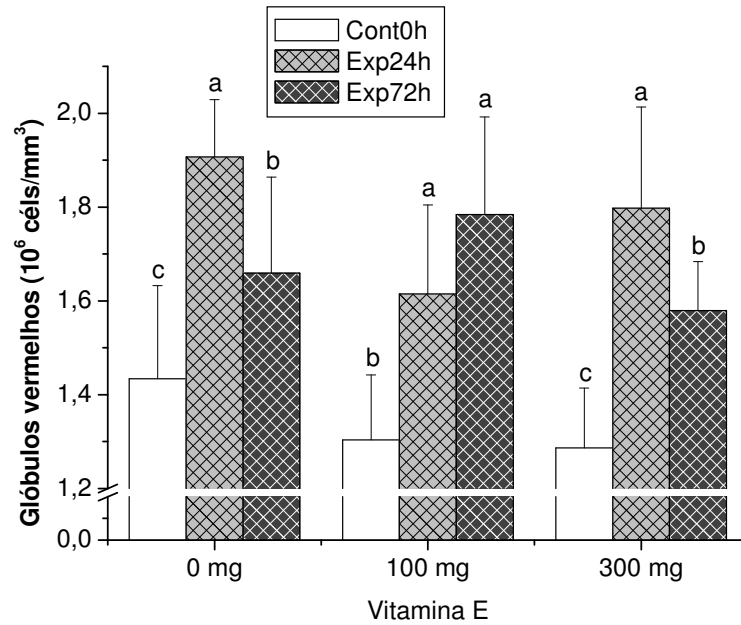
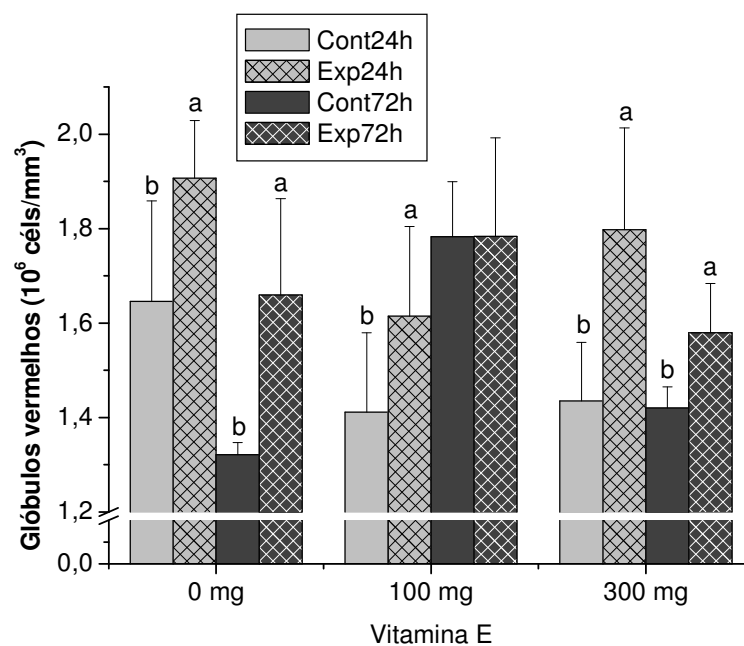


Figura 18. Glóbulos vermelhos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Volume corpuscular médio (VCM)

Nos peixes do grupo controle o valor médio de VCM observado foi de 153,32 fL ($\pm 5,49$ fL). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores de VCM significativamente maiores em relação ao do grupo controle, porém não diferiram entre si (Figura 19). Nos animais alimentados com a dieta sem suplementação de vitamina E houve diminuição do VCM no grupo E24h e aumento do VCM no grupo C72h-0mg, comparados ao grupo C0h (Figuras 20 e 21). O mesmo resultado foi observado para os animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figuras 20 e 21). Já para os animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E houve diminuição do VCM no grupo E72h, comparado ao C0h (Figura 21). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-100mg apresentou o maior valor de VCM (Figura 19). Já se comparando os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, foi o grupo E72h-300mg que apresentou o maior valor de VCM (Figura 19). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C24h e E24h diferiram entre si, bem como os grupos C72h e E72h (Figura 22).

Figura 19. Volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

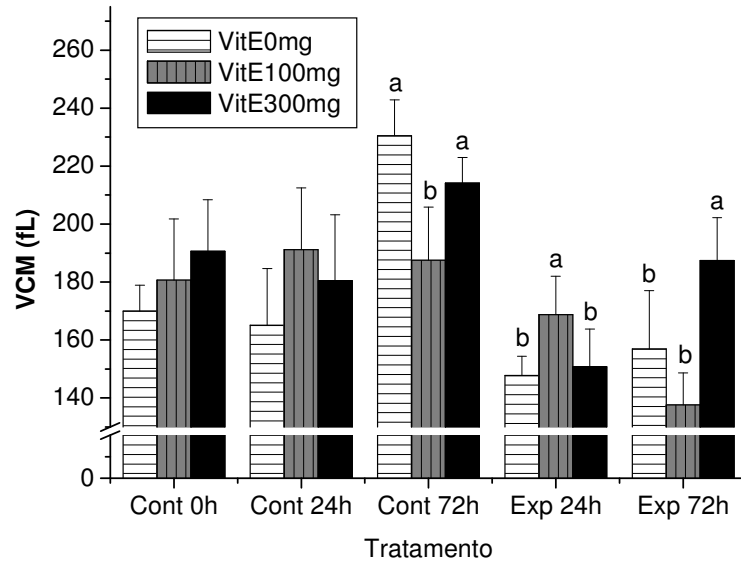


Figura 20. Volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

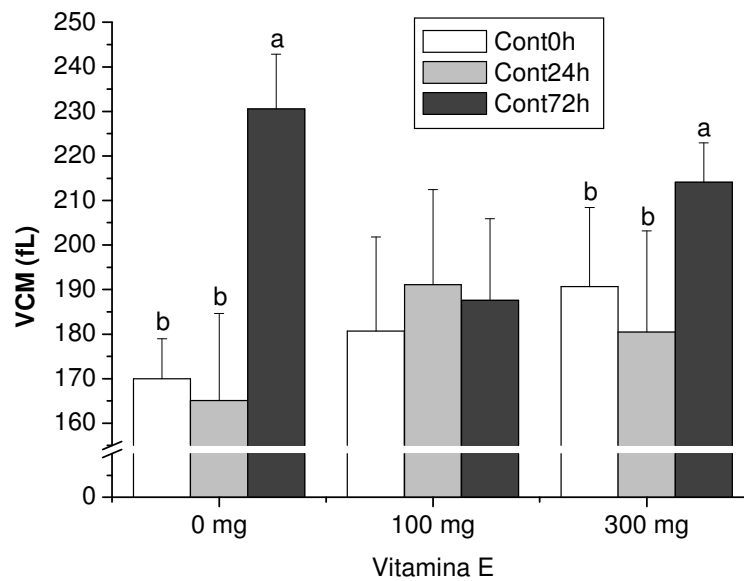


Figura 21. Volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

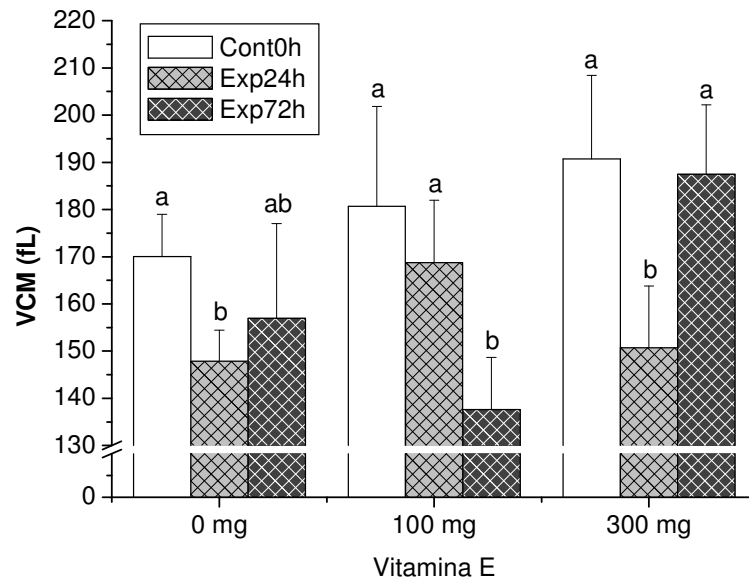
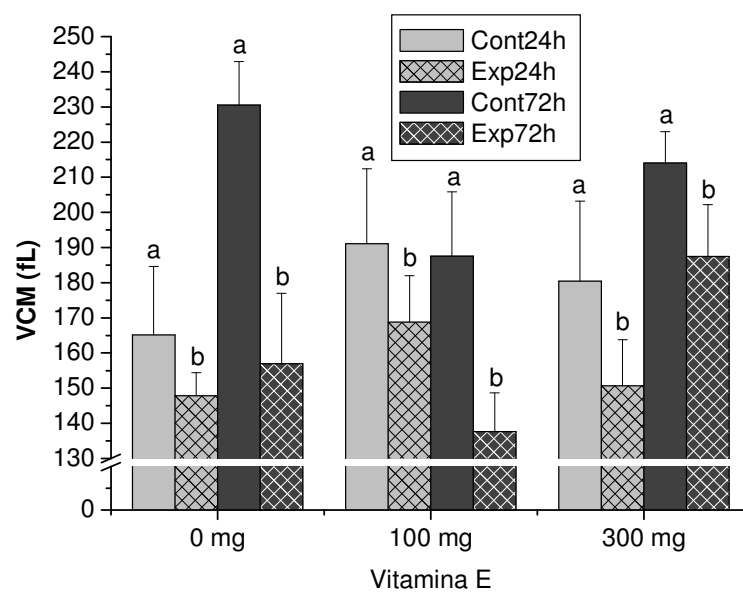


Figura 22. Volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Hemoglobina corpuscular média (HCM)

Nos peixes do grupo controle o valor médio de HCM observado foi de 51,38 pg ($\pm 2,83$ pg). Este não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg, que também não diferiram entre si (Figura 23). Foi observada redução significativa da HCM no grupo E72h-0mg em relação ao grupo C0h-0mg (Figura 25). O mesmo foi observado para os animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E, porém houve também diminuição da HCM no grupo C72h, comparado ao grupo C0h (Figura 24 e 25). Já no grupo de animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E observou-se aumento da HCM no grupo C24h e diminuição nos grupos C72h e E72h, comparados ao grupo C0h (Figura 24 e 25). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-100mg apresentou o maior valor de HCM (Figura 23). Já quando os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E foram comparados entre si, foi o grupo E72h-300mg que apresentou o maior valor de HCM (Figura 23). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 26). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada (Figura 26).

Figura 23. Hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

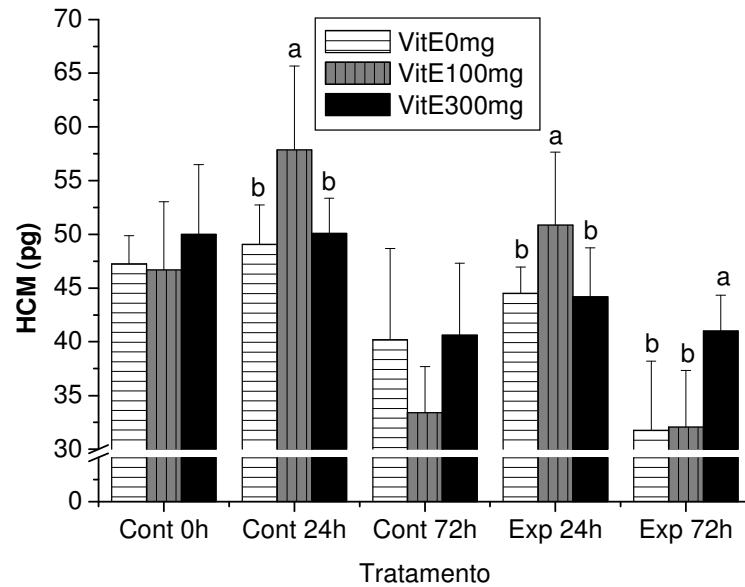


Figura 24. Hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

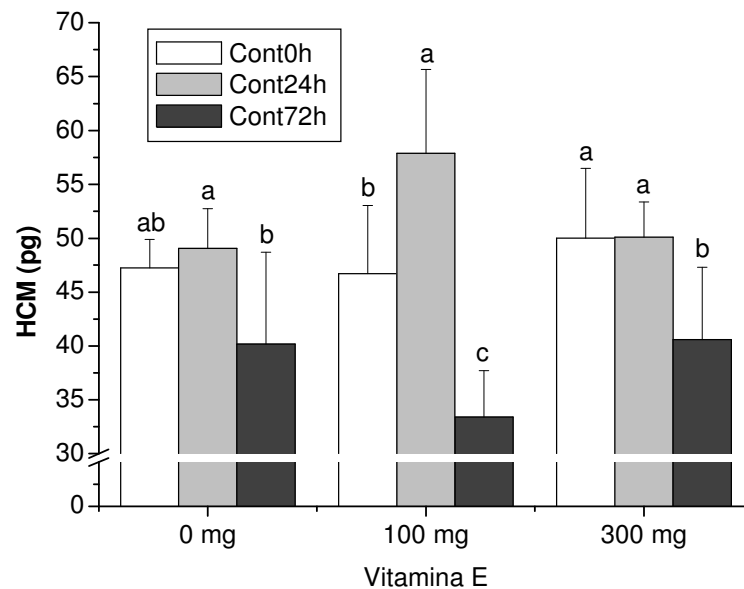


Figura 25. Hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

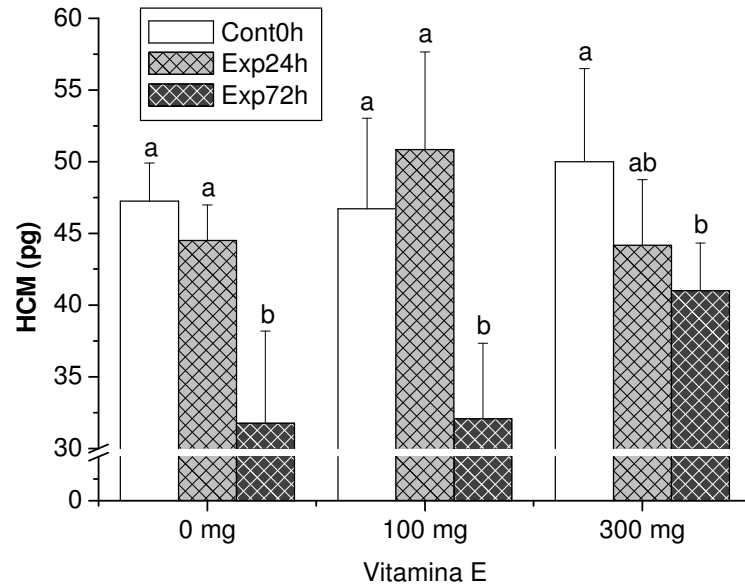
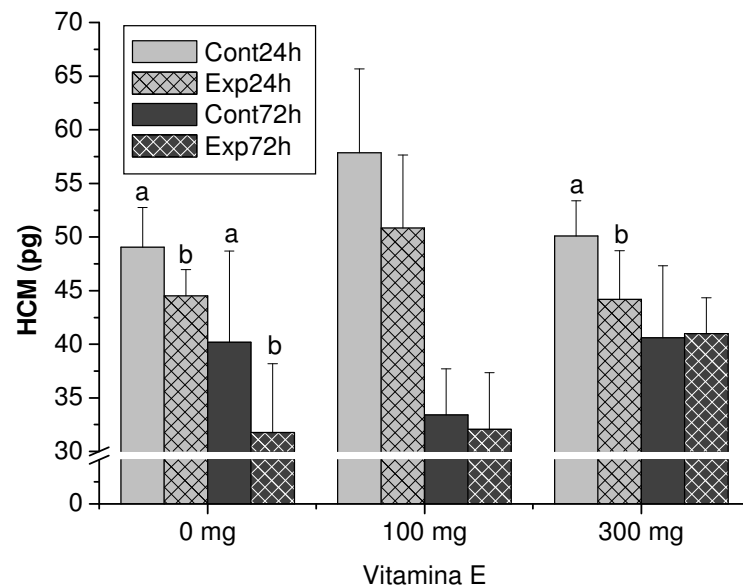


Figura 26. Hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

O valor médio de CHCM observado no grupo controle foi de 33,86 g/dL ($\pm 3,19$ g/dL). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores de CHCM significativamente menores em relação ao grupo controle, porém não diferiram entre si (Figura 27). Houve diminuição na CHCM dos grupos C72h-0mg e E72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 28 e 29). O mesmo resultado foi observado para os animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E, porém houve também aumento da CHCM no grupo E24h, comparado ao grupo C0h (Figuras 28 e 29). Já no grupo de animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg observou-se aumento da CHCM no grupo E24h e diminuição nos grupos C72h e E72h, comparados ao grupo C0h (Figuras 28 e 29). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si. O mesmo foi observado para os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E (Figura 27). Porém, em todas as três dietas os grupos E24h e E72h diferiram entre si, assim como os grupos C24h e C72h (Figuras 28 e 29). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C24h e E24h não diferiram entre si (Figura 30). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figura 30).

Figura 27. Concentração de hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.

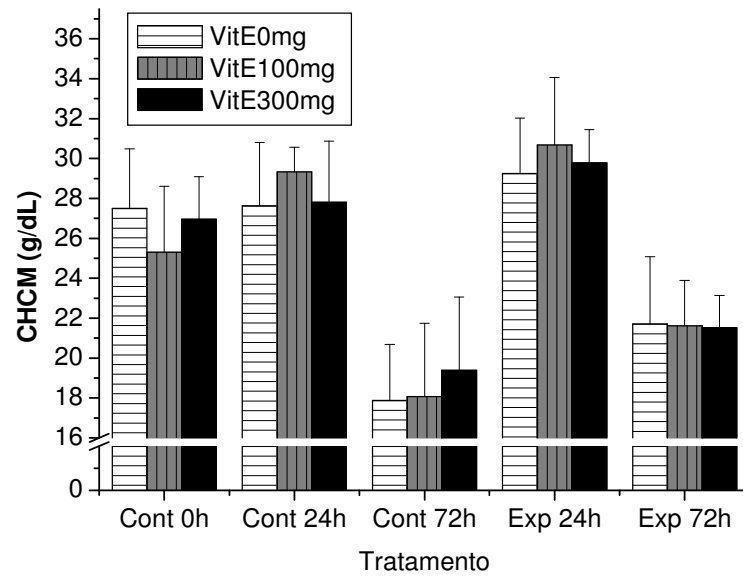


Figura 28. Concentração de hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

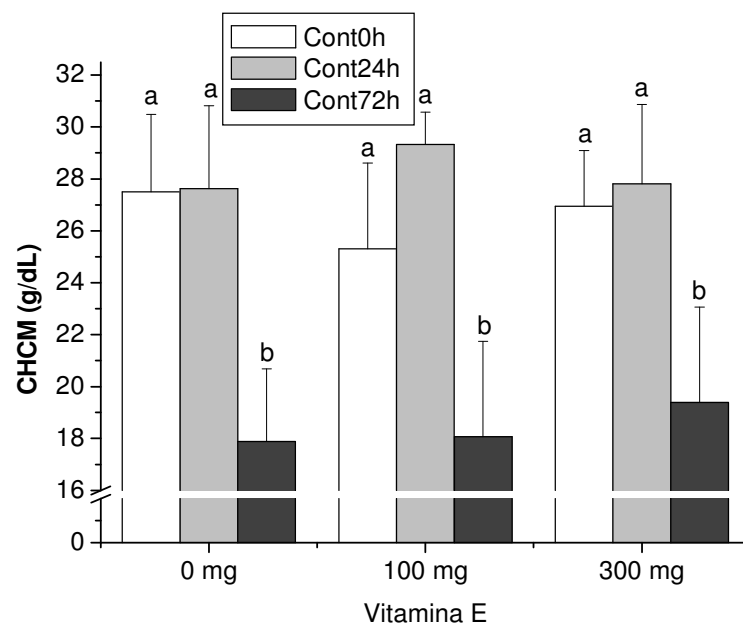


Figura 29. Concentração de hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

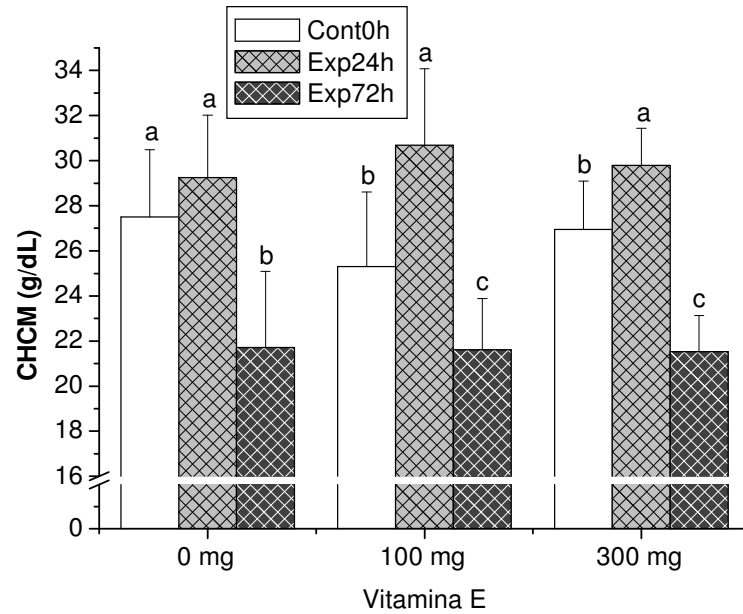
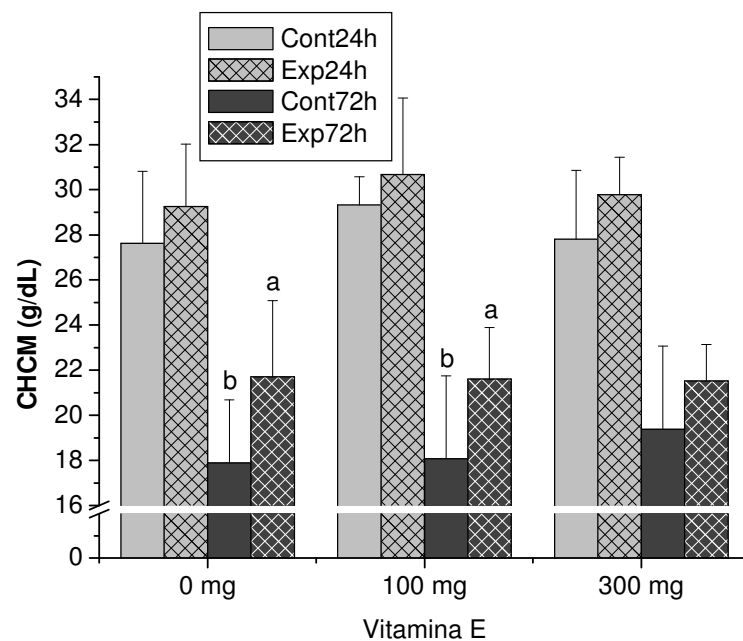


Figura 30. Concentração de hemoglobina corpuscular média de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



5.3. Intermediários metabólicos

Cortisol plasmático

O grupo controle apresentou concentração média de cortisol plasmático de 6,13 µg/dL ($\pm 3,39$ µg/dL), valor este que não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg, que também não diferiram entre si (Figura 31). Houve aumento significativo na concentração de cortisol plasmático em todos os grupos E24h, retornando aos valores basais em 72h (Figura 33). Dos grupos controle, o único a apresentar aumento nos níveis de cortisol plasmático foi o C72h-0mg, comparado ao seu respectivo C0h (Figura 32). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 31). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C24h e E24h diferiram entre si (Figura 34). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada (Figura 34).

Figura 31. Cortisol plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

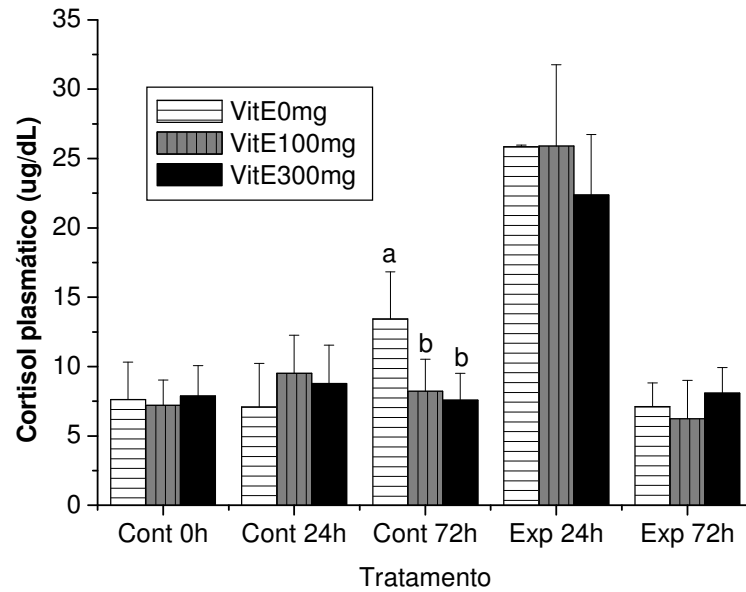


Figura 32. Cortisol plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

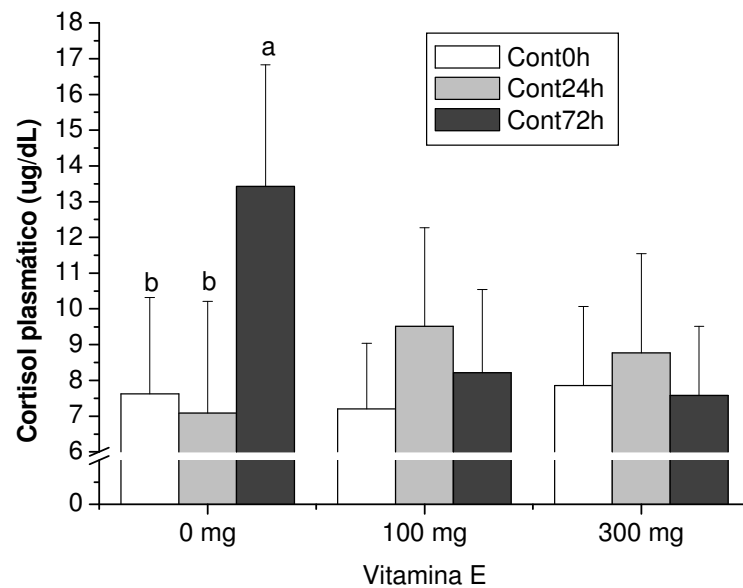


Figura 33. Cortisol plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

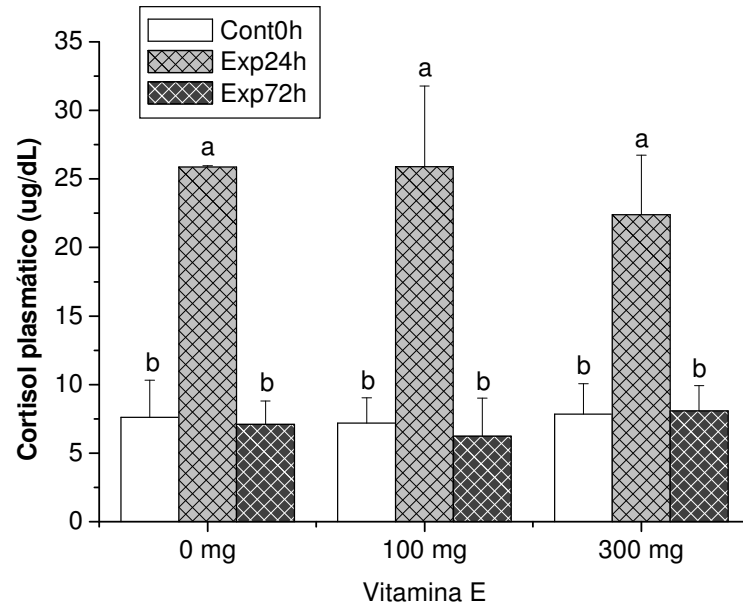
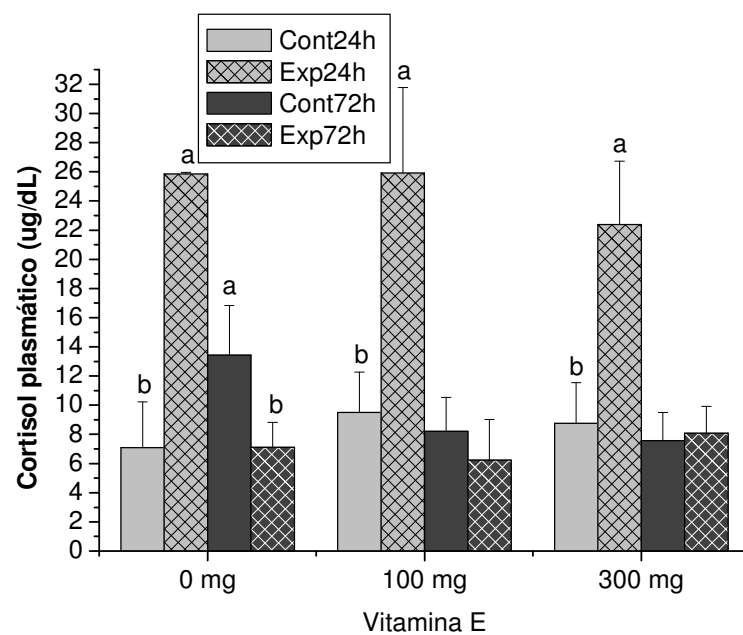


Figura 34. Cortisol plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Glicose plasmática

A concentração de glicose plasmática média observada nos animais do grupo controle foi de 99,87 mg/dL ($\pm 10,50$ mg/dL). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo controle. Comparando-se os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg entre si, observamos o menor nível de glicose plasmática nos animais alimentados com dieta não suplementada com vitamina E (Figura 35). Houve aumento no nível de glicose plasmática nos grupos E24h-0mg e E72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figura 37). Tanto no grupo de animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E como no grupo de animais alimentados com 300 mg de vitamina E, houve redução no nível de glicose plasmática no grupo C72h em relação ao seu respectivo C0h (Figura 36). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 35). O mesmo foi observado para os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E (Figura 35). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C72h e E72h diferiram entre si (Figura 38). Já os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença nos animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 38).

Figura 35. Glicose plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

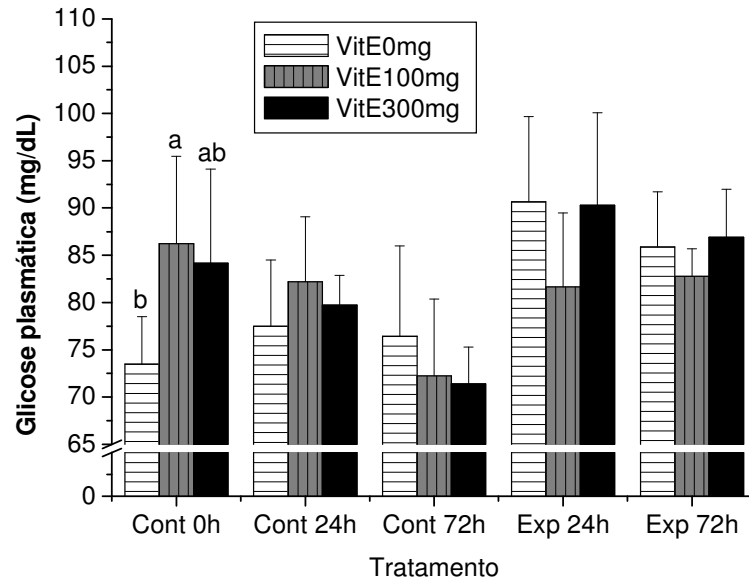


Figura 36. Glicose plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

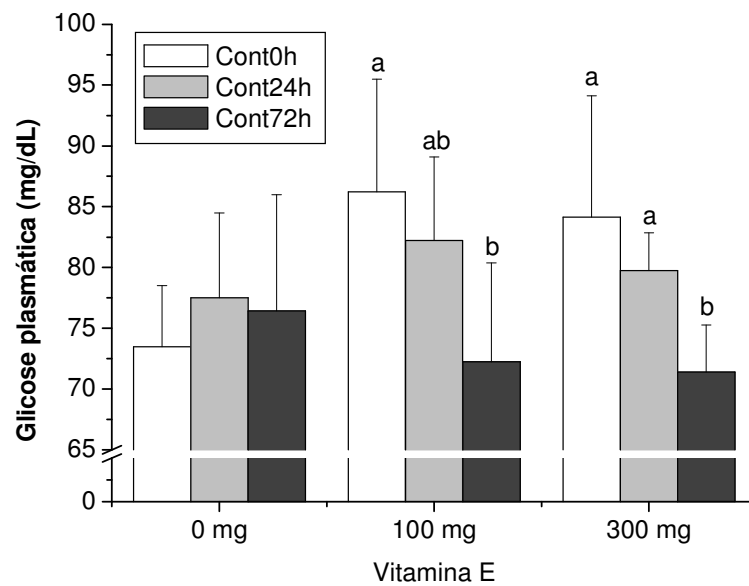


Figura 37. Glicose plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

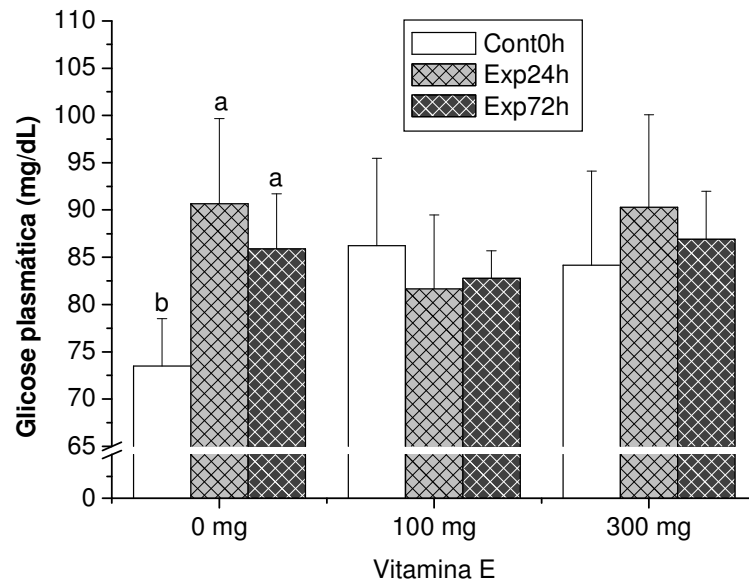
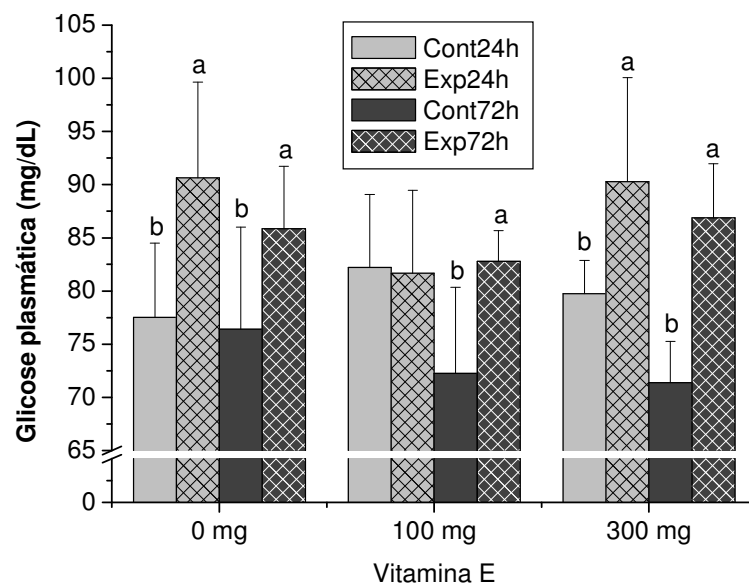


Figura 38. Glicose plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Lactato plasmático

O grupo controle apresentou concentração média de lactato plasmático de 2,25 $\mu\text{mols/mL}$ ($\pm 0,39 \mu\text{mols/mL}$), valor este que não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg, que também não diferiram entre si (Figura 39). Houve aumento da concentração plasmática de lactato nos grupos E24h-0mg e C72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figura 40 e 41). Já no grupo de peixes alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E foi observada redução no nível de lactato plasmático no grupo C24h em relação ao grupo C0h (Figura 40). No grupo de animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg, observou-se aumento significativo de lactato plasmático nos grupos E24h, C72h e E72h, em relação ao grupo C0h (Figura 40 e 41). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-100mg apresentou o menor valor de lactato plasmático (Figura 39). Os grupos E72h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 39). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C24h e E24h diferiram entre si, porém o mesmo não aconteceu com os grupos C72h e E72h (Figura 42).

Figura 39. Lactato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

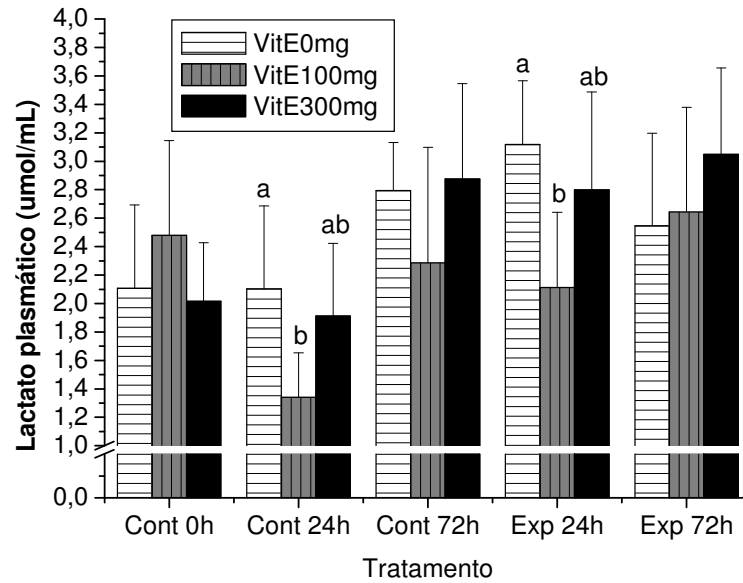


Figura 40. Lactato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

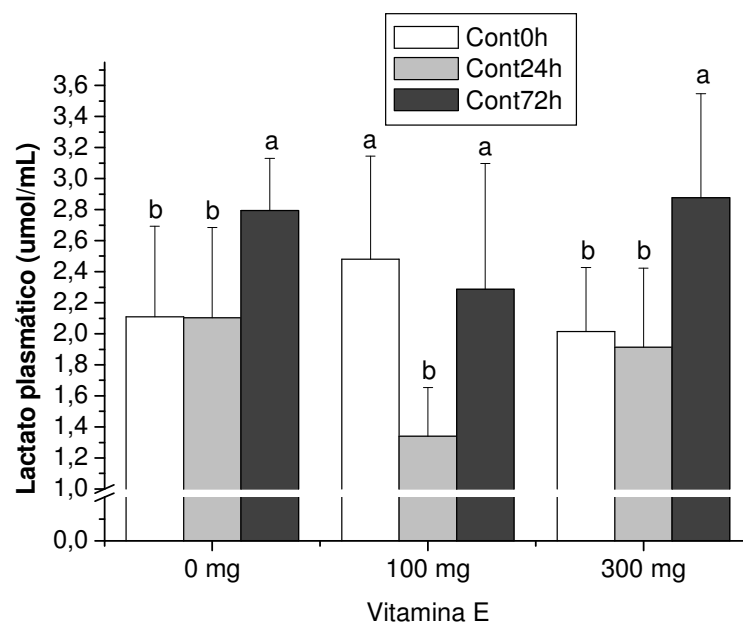


Figura 41. Lactato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

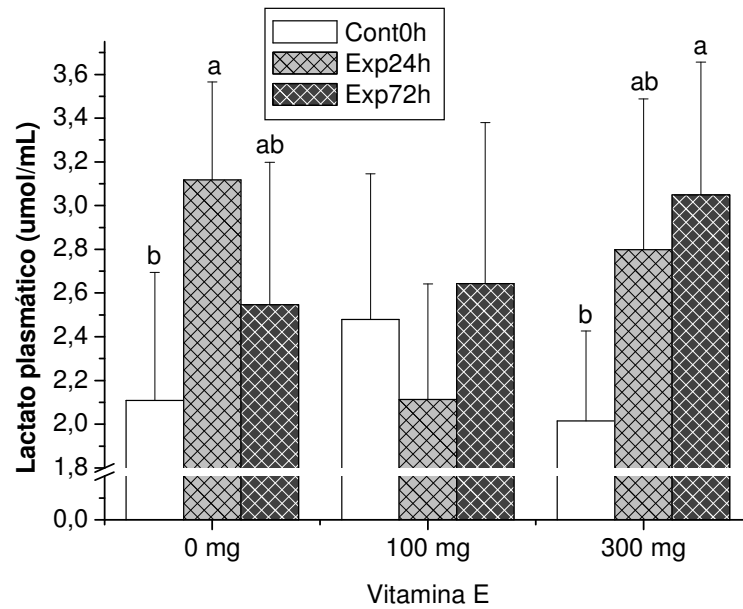
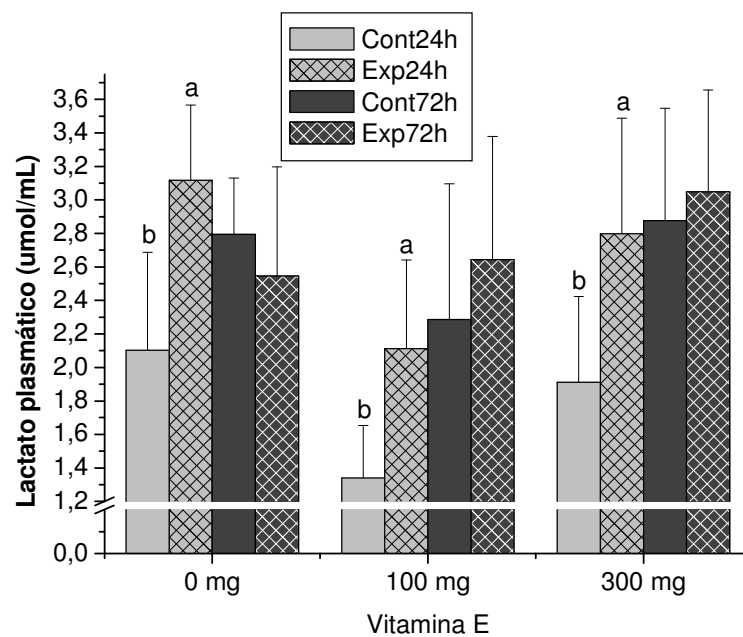


Figura 42. Lactato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Piruvato plasmático

A concentração média de piruvato plasmático observada nos animais do grupo controle foi de 0,58 $\mu\text{mols/mL}$ ($\pm 0,07 \mu\text{mols/mL}$). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram níveis de piruvato plasmático significativamente menores em relação ao grupo controle, porém não diferiram entre si (Figura 43). Houve aumento de piruvato plasmático nos grupos C72h-0mg e E72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figura 44 e 45). O mesmo foi observado nos animais alimentados com ambas as dietas suplementadas, porém observou-se também aumento no nível plasmático de piruvato no grupo C24h-100mg e redução no grupo C24h-300mg, comparados aos seus respectivos C0h (Figura 44 e 45). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 43). O mesmo foi observado para os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E (Figura 43). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentam diferença apenas nos peixes alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 46). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figura 46). Em todos os níveis de vitamina E os grupos E24h e E72h diferiram entre si (Figura 45).

Figura 43. Piruvato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

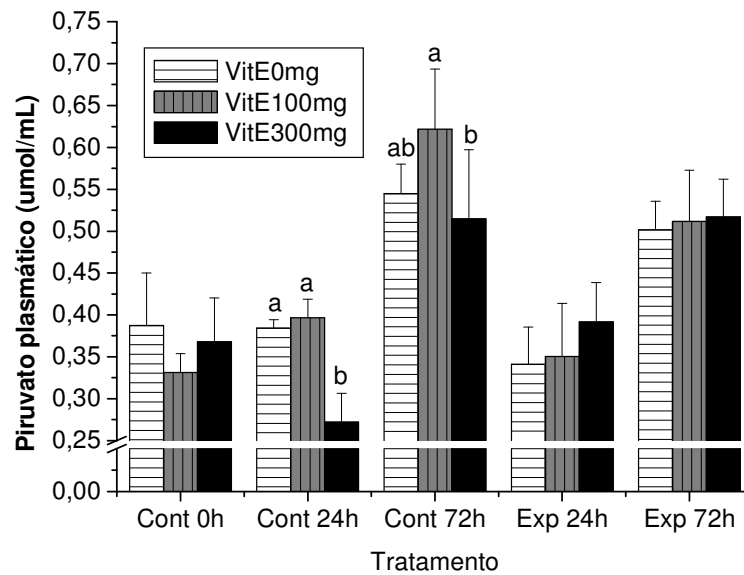


Figura 44. Piruvato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

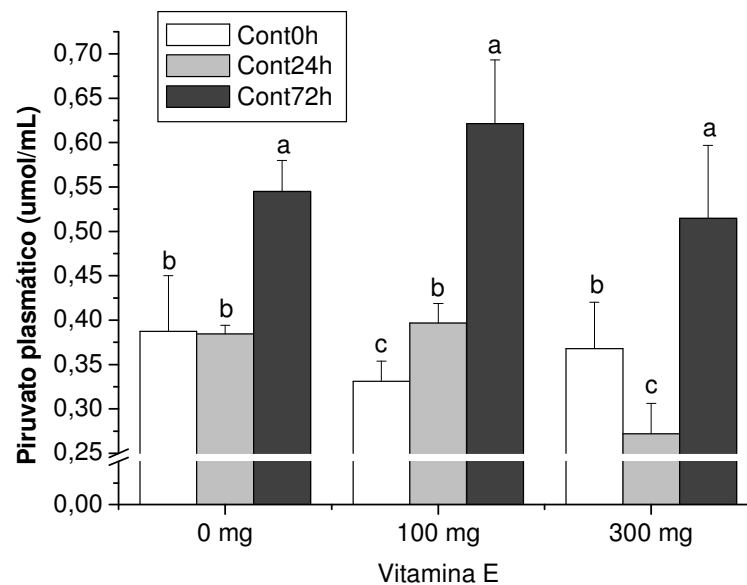


Figura 45. Piruvato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

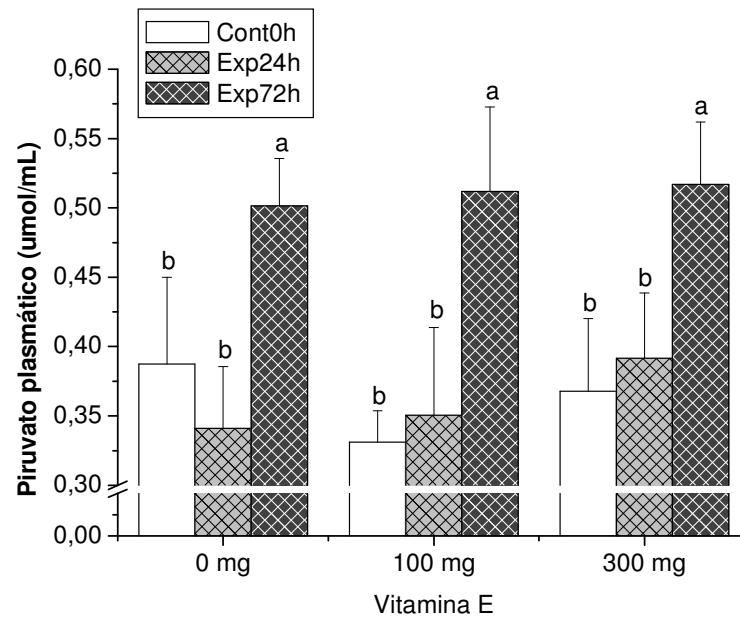
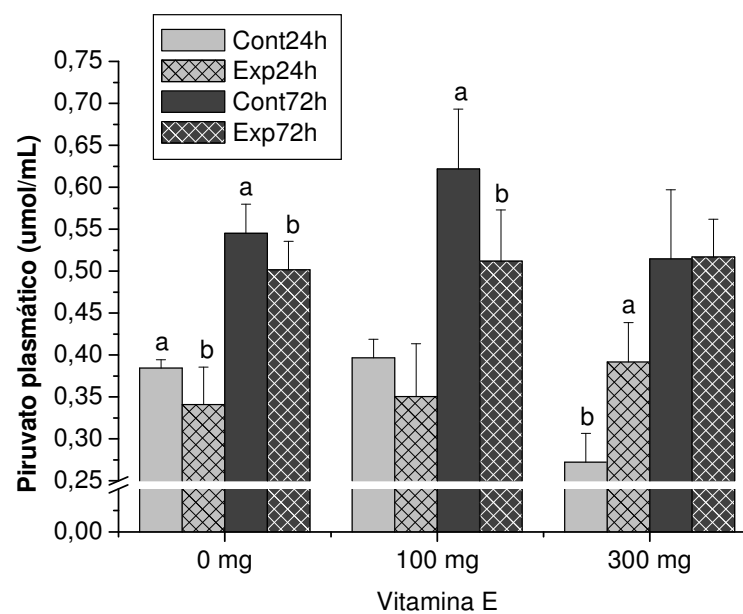


Figura 46. Piruvato plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Amônia plasmática

O grupo controle apresentou concentração média de amônia plasmática de 6,70 $\mu\text{mols/mL}$ ($\pm 1,35 \mu\text{mols/mL}$), valor este que não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg, que também não diferiram entre si (Figura 47). Houve redução na concentração de amônia plasmática nos grupos E24h-0mg e E72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figura 49). O mesmo resultado foi observado para os animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, porém nesses animais também houve redução na concentração de amônia plasmática no grupo C72h, comparado ao grupo C0h (Figuras 48 e 49). Nos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E, houve diminuição na concentração de amônia plasmática nos grupos C24h e C72h, comparados ao grupo C0h-300mg (Figuras 48). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-300mg apresentou o maior valor de amônia plasmática (Figura 47). O mesmo fato foi observado comparando-se os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E (Figura 47). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com ambas as dietas suplementadas (Figura 50). O mesmo resultado foi observado quando comparamos os grupos C72h e E72h (Figura 50).

Figura 47. Amônia plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

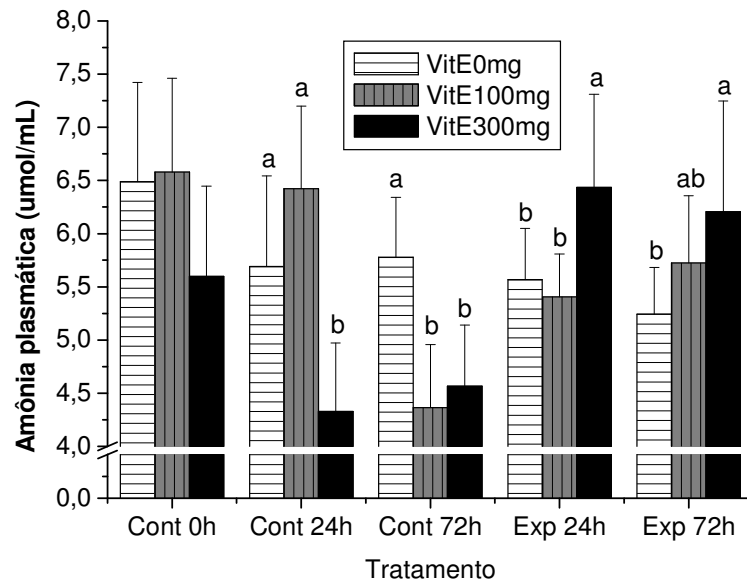


Figura 48. Amônia plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

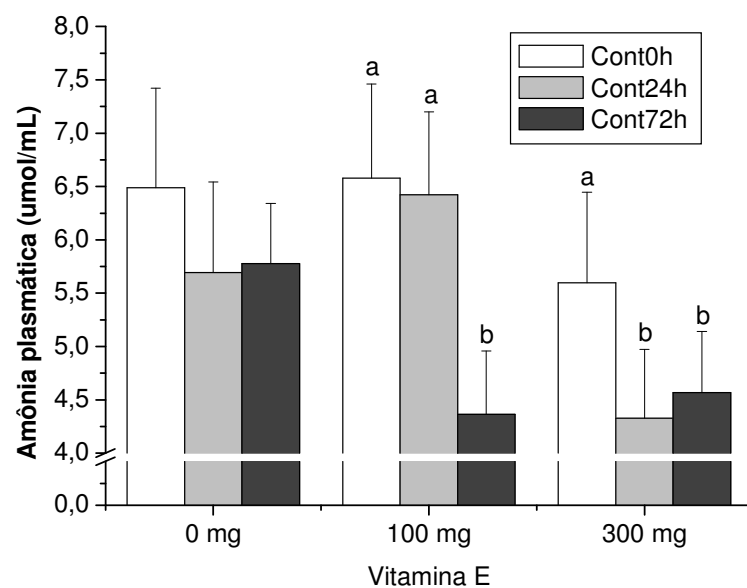


Figura 49. Amônia plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

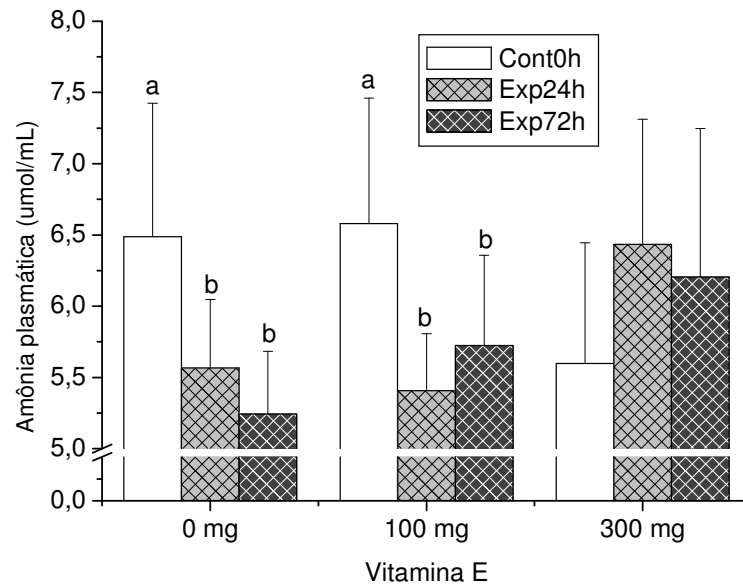
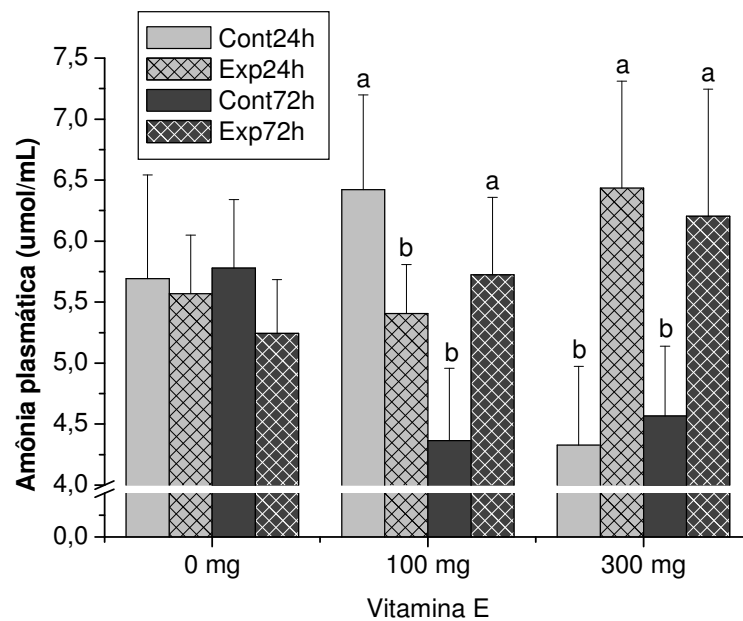


Figura 50. Amônia plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Proteína plasmática

O grupo controle apresentou uma concentração média de proteína plasmática de 18,03 mg/mL ($\pm 1,38$ mg/mL), valor este que não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg. Comparando-se estes grupos entre si, observamos a maior concentração de proteína plasmática no grupo C0h-300mg (Figura 51). Observou-se aumento nos níveis plasmáticos de proteína nos grupos C24h-0mg e E24h-0mg, ambos mantendo-se após 72h, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 52 e 53). O mesmo resultado foi observado para o grupo de animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figuras 52 e 53). Já no grupo de peixes alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E, observou-se aumento no nível de proteína plasmática nos grupos C24h, C72h e E72h, comparados ao grupo C0h (Figuras 52 e 53). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-300mg apresentou o menor valor de proteína plasmática (Figura 51). Já se comparando os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E72h-300mg apresentou o maior valor de proteína plasmática (Figura 51). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos peixes alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 54). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentam diferença apenas nos animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figura 54).

Figura 51. Proteína plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

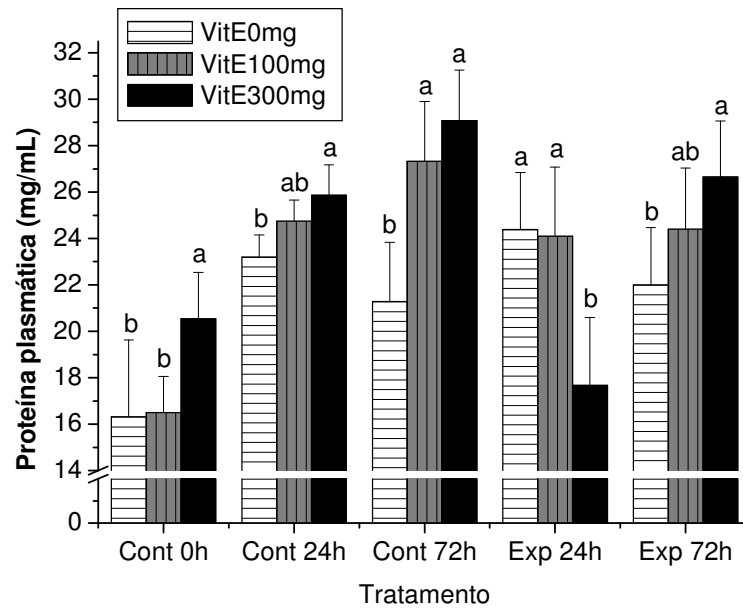


Figura 52. Proteína plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

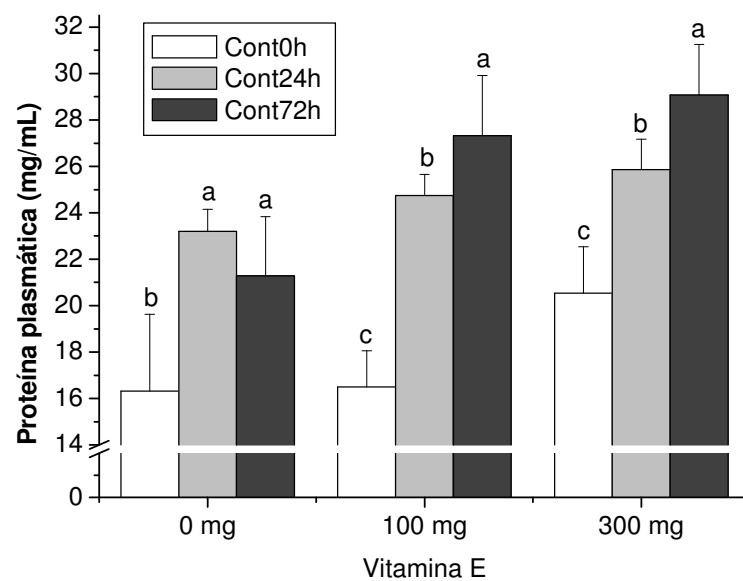


Figura 53. Proteína plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

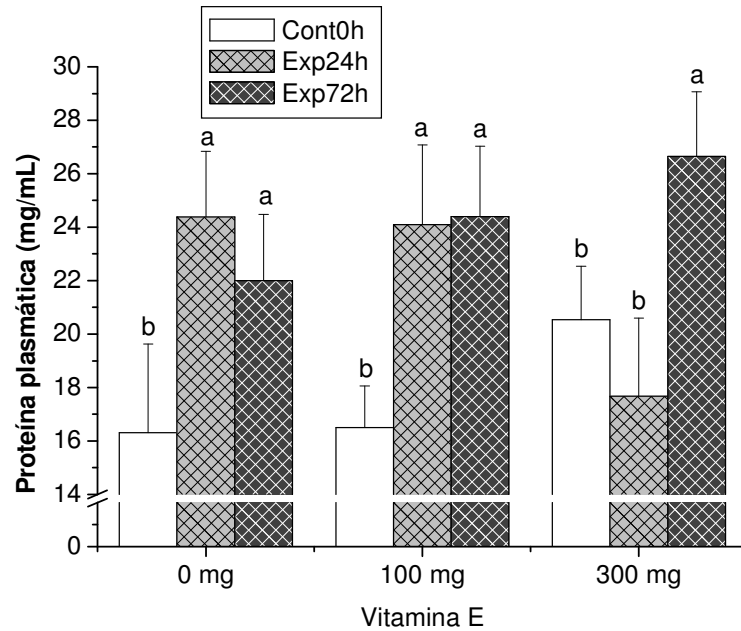
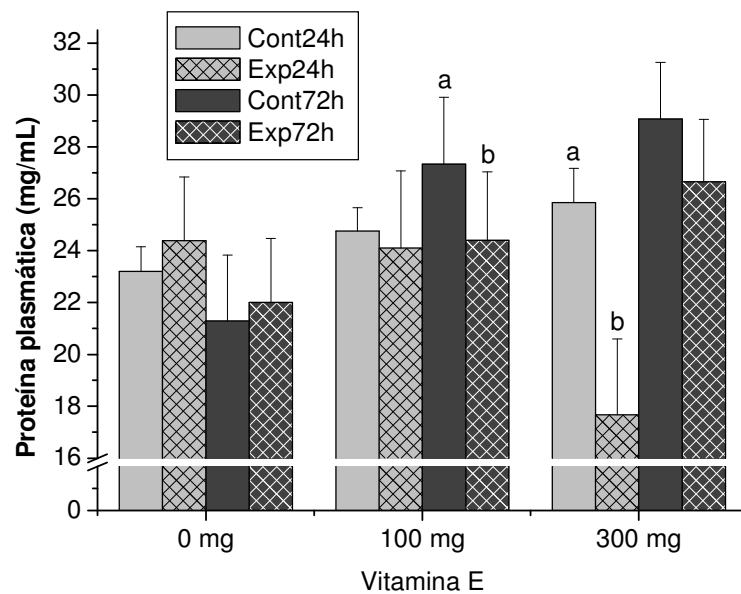


Figura 54. Proteína plasmática de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Aminoácidos livres plasmáticos

Nos peixes do grupo controle, a concentração média de aminoácidos livres plasmáticos foi de 4,63 $\mu\text{mols/mL}$ ($\pm 0,92$ $\mu\text{mols/mL}$). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo controle, porém não diferiram entre si (Figura 55). Houve aumento nos níveis de aminoácidos plasmáticos nos grupos E24h-0mg e C72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 56 e 57). Nos grupos de peixes alimentados com dietas suplementadas com 100 e 300 mg de vitamina E, observou-se aumento dos níveis plasmáticos de aminoácidos livres nos grupos C24h e E24h, ambos mantendo-se elevados após 72h (Figuras 56 e 57). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si, enquanto que nos grupos E72h quando comparados, a maior concentração plasmática de aminoácidos foi encontrada no grupo E72h-300mg (Figuras 55). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos peixes alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figuras 58). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figuras 58).

Figura 55. Aminoácidos livres plasmáticos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

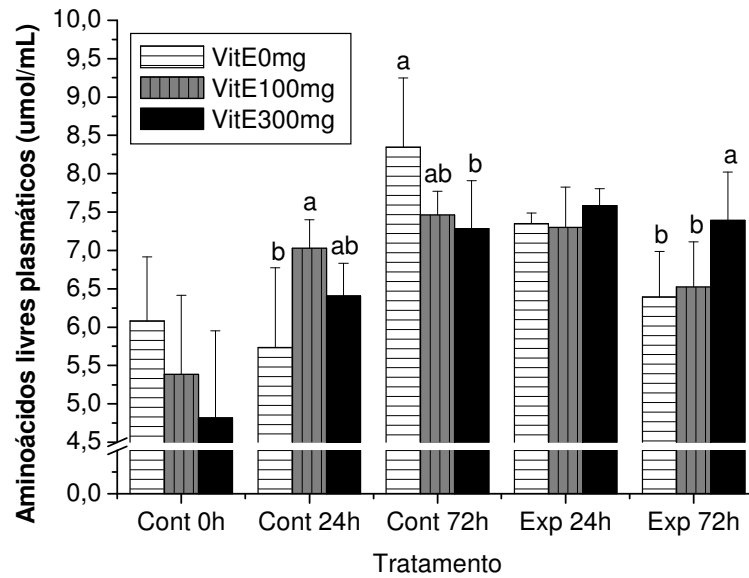


Figura 56. Aminoácidos livres plasmáticos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

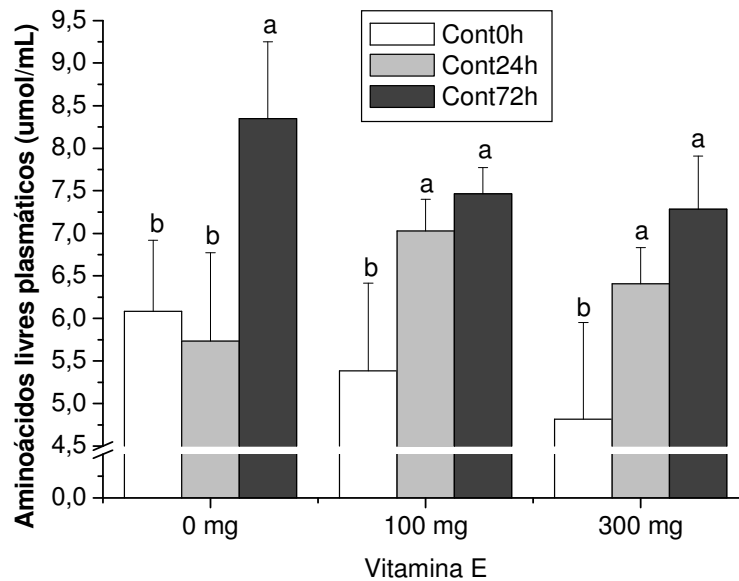


Figura 57. Aminoácidos livres plasmáticos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

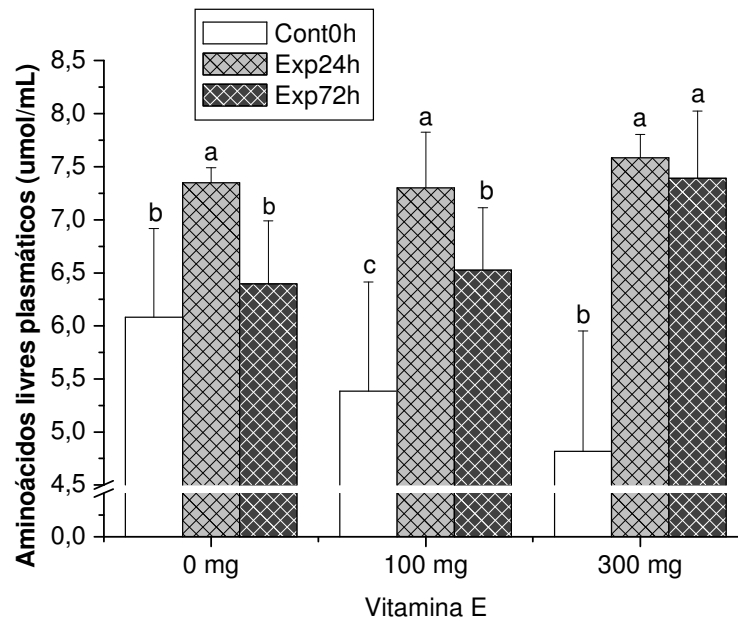
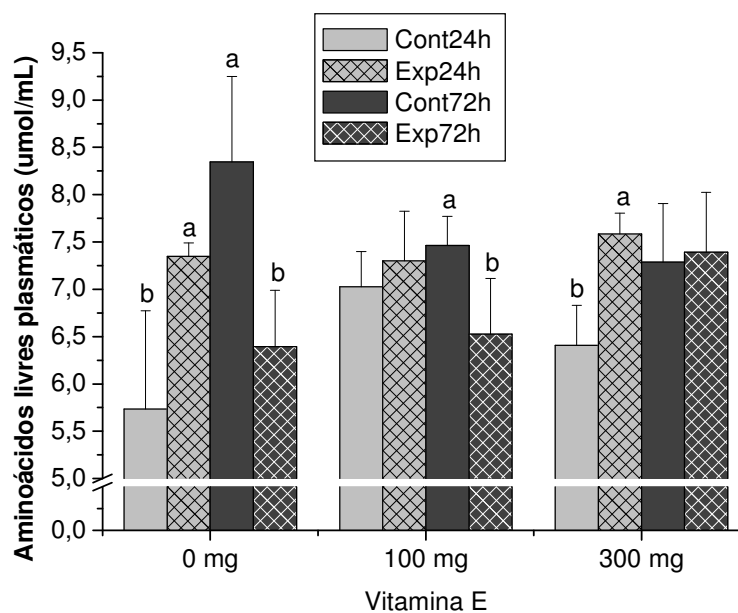


Figura 58. Aminoácidos livres plasmáticos de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Sódio plasmático

O grupo controle apresentou concentração média de sódio plasmático de 157,63 mEq/L ($\pm 6,16$ mEq/L). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo controle, porém não diferiram entre si (Figura 59). Foi observada diminuição na concentração plasmática de sódio nos grupos C24h-0mg, C72h-0mg e E72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 60 e 61). Os animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, apresentaram tal redução nos grupos E24h, C72h e E72h, quando comparados ao grupo C0h (Figuras 60 e 61). O mesmo perfil foi observado para os animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figuras 60 e 61). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-300mg apresentou o menor valor de sódio plasmático (Figura 59). Já os grupos E72h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 59). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos peixes alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 62). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C72h e E72h não diferiram entre si (Figura 62).

Figura 59. Sódio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

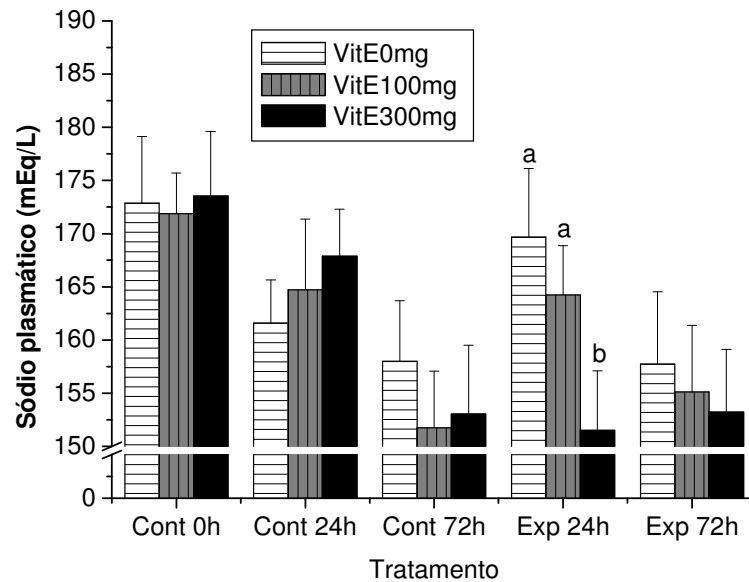


Figura 60. Sódio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

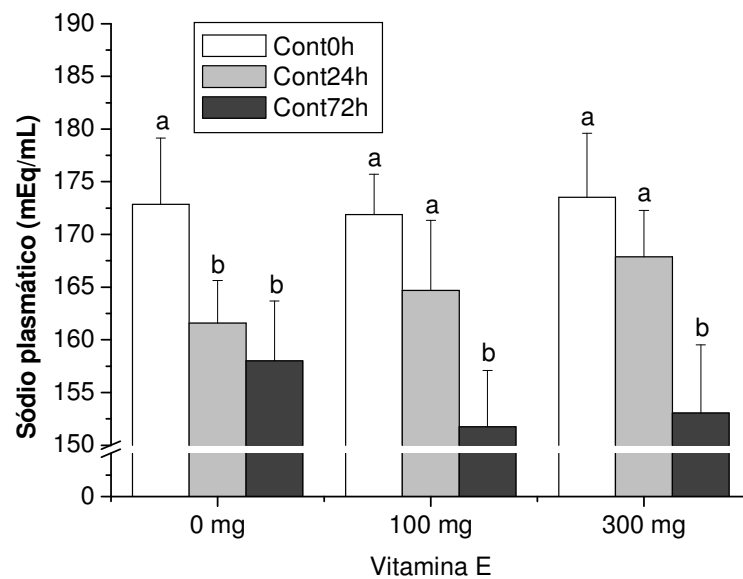


Figura 61. Sódio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

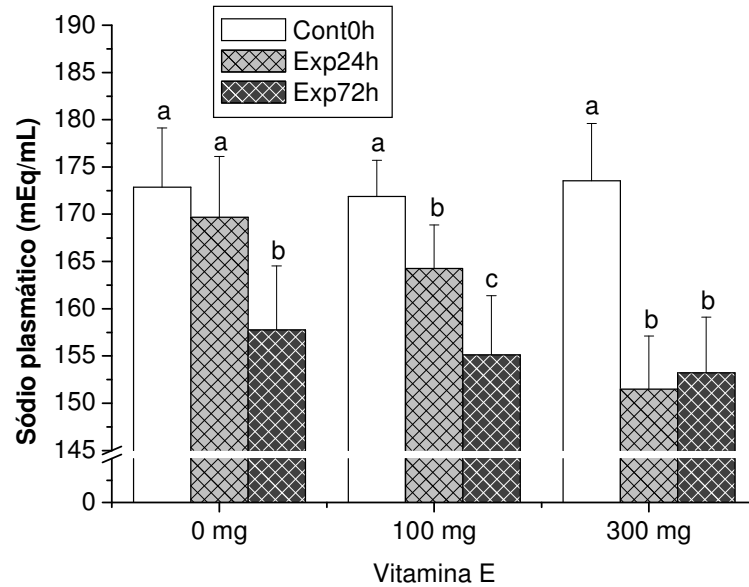
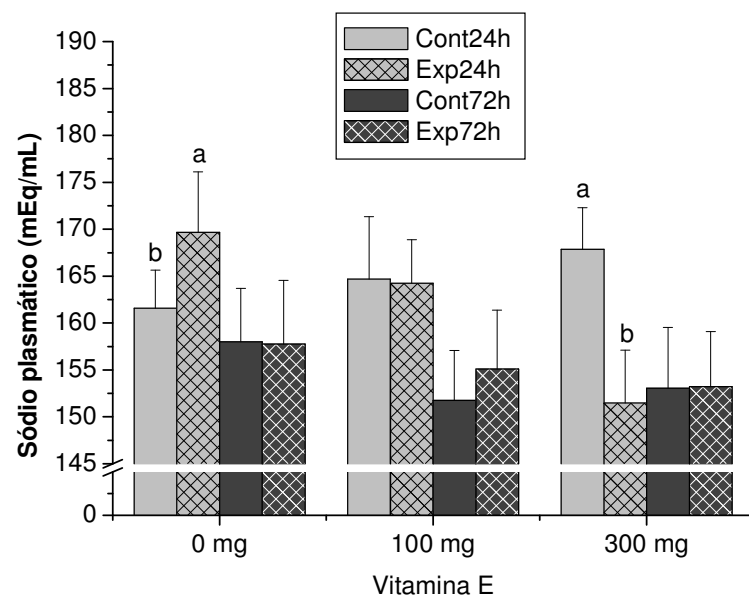


Figura 62. Sódio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à a variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Potássio plasmático

A concentração média de potássio plasmático observada nos animais do grupo controle foi de 2,63 mEq/L ($\pm 0,18$ mEq/L). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram níveis de potássio plasmático significativamente menores em relação ao grupo controle, porém não diferiram entre si (Figura 63). Houve uma redução significativa no nível de potássio plasmático no grupo C72h-300mg, comparado ao grupo C0h-300mg (Figura 64). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 63). O mesmo foi observado para os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E (Figura 63). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos peixes alimentados com dieta não suplementada (Figura 66). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C72h e E72h diferiram entre si (Figura 66).

Figura 63. Potássio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

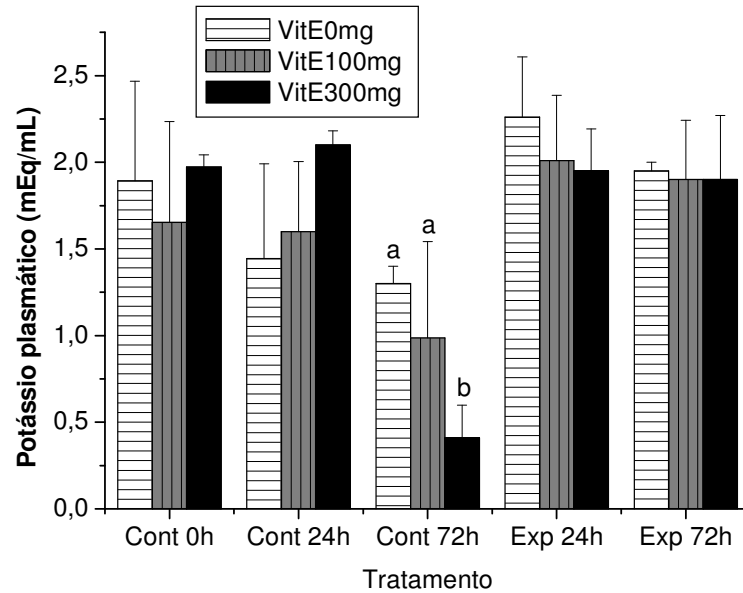


Figura 64. Potássio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

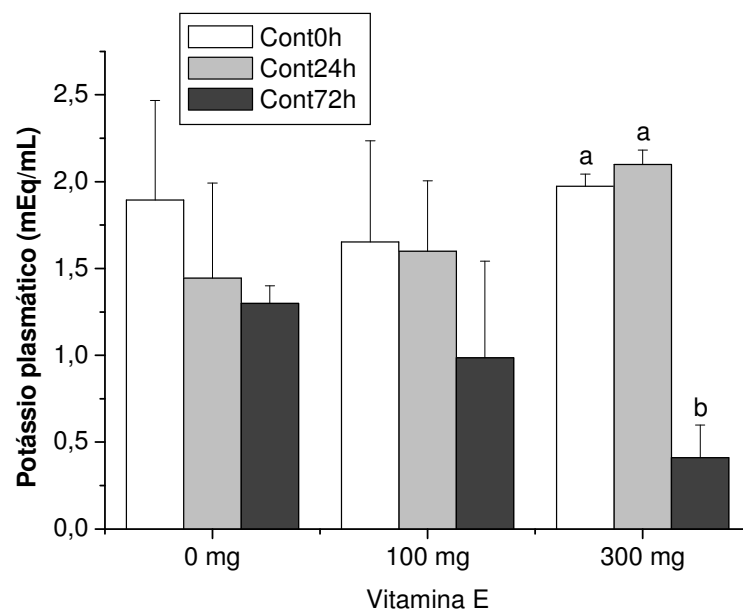


Figura 65. Potássio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

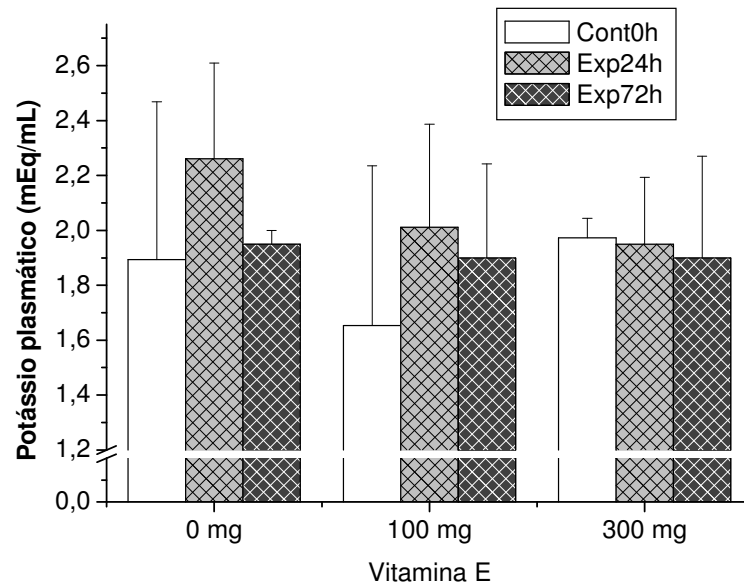
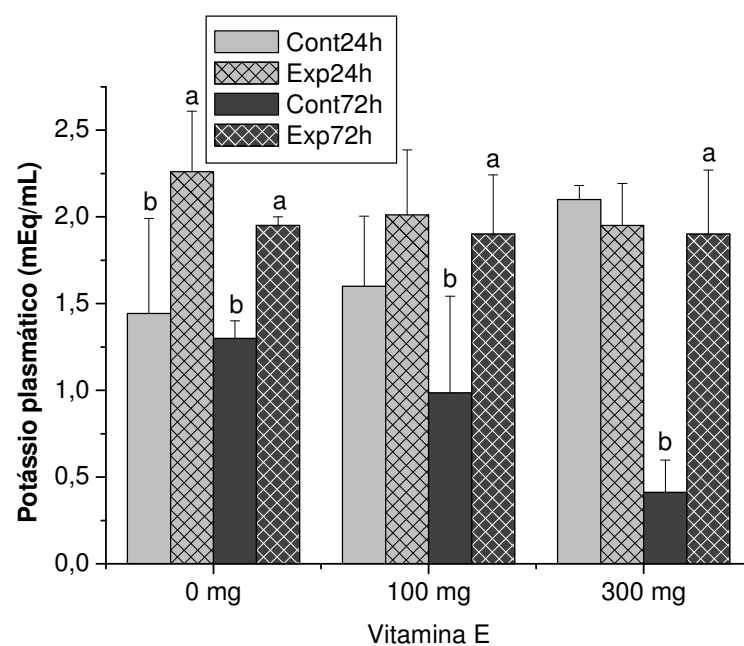


Figura 66. Potássio plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Cloreto plasmático

O grupo controle apresentou concentração média de cloreto plasmático de 142,45 mEq/L ($\pm 11,68$ mEq/L). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo controle. Estes grupos diferiram entre si, sendo que o grupo C0h-300mg apresentou os maiores valores de cloreto plasmático (Figura 67). Foram observados valores de cloreto plasmático maiores nos grupos C24h-0mg, E24h-0mg, C72h-0mg e E72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 68 e 69). Os animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E apresentaram aumento de cloreto plasmático nos grupos C24h e E24h, com redução em ambos após 72h, comparados ao grupo C0h (Figuras 68 e 69). Já os animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E apresentaram redução nos grupos C24h e E24h, ambos mantendo-se baixos após 72h, comparados ao grupo C0h (Figuras 68 e 69). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-0mg apresentou o maior valor de cloreto plasmático (Figura 67). O mesmo fato foi observado comparando-se os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E (Figura 67). Em todos os níveis de vitamina E os grupos C24h e E24h diferiram entre si (Figura 70). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 70).

Figura 67. Cloreto plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

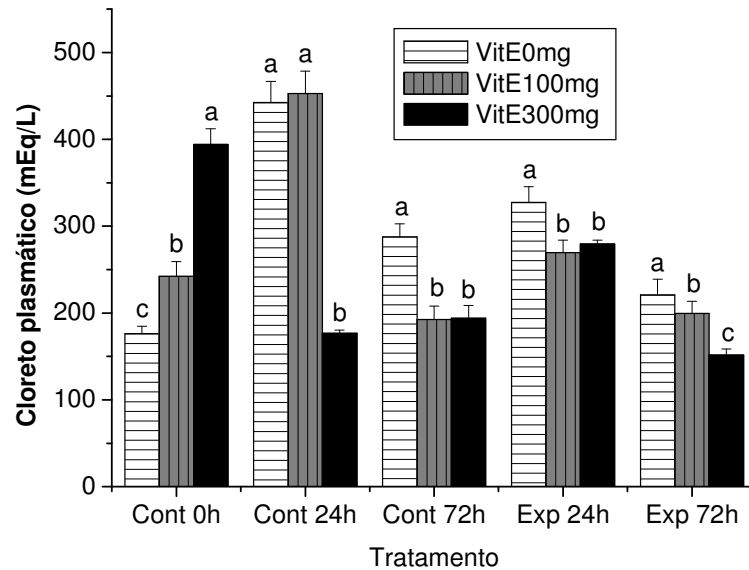


Figura 68. Cloreto plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

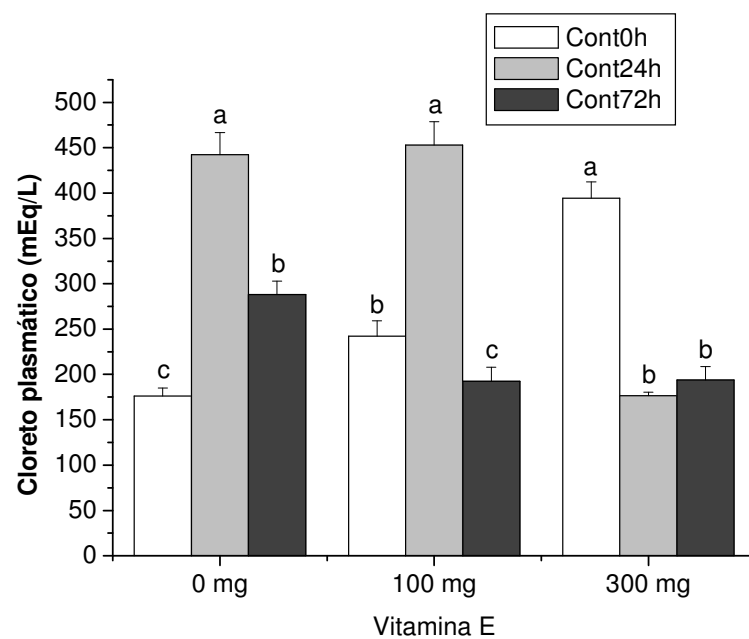


Figura 69. Cloreto plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

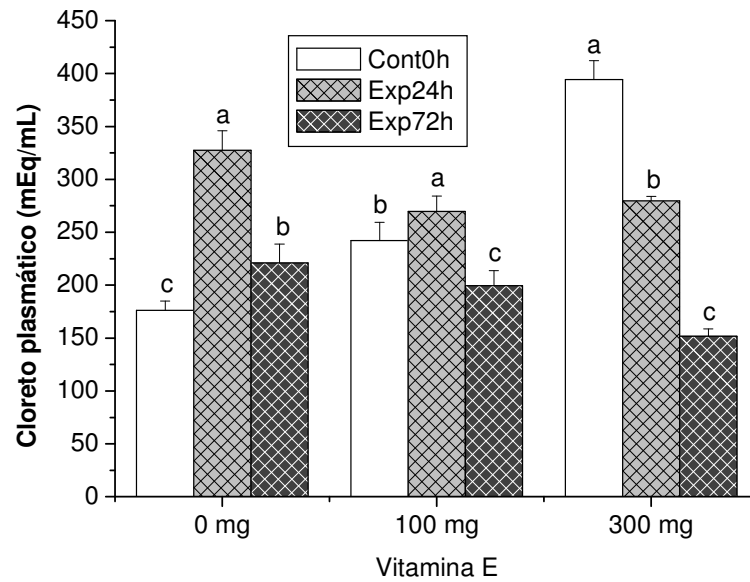
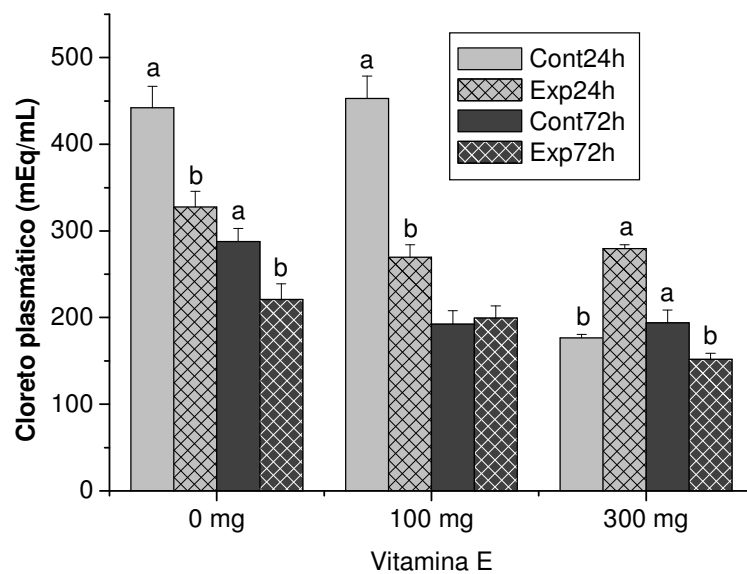


Figura 70. Cloreto plasmático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Glicogênio Hepático

O grupo controle apresentou concentração média de glicogênio hepático de 624,91 $\mu\text{mols/g}$ ($\pm 83,05$ $\mu\text{mols/g}$), valor este que não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg, que também não diferiram entre si (Figura 71). Houve redução nos valores de glicogênio hepático no grupo C72h-0mg, comparado ao grupo C0h-0mg (Figura 72). O mesmo resultado foi observado para os animais alimentados com ambas as dietas suplementadas (Figura 72). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 71). O mesmo foi observado para os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E (Figura 71). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos E24h e E72h diferiram entre si (Figura 73), bem como os grupos C72h e E72h (Figura 74).

Figura 71. Glicogênio hepático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento.

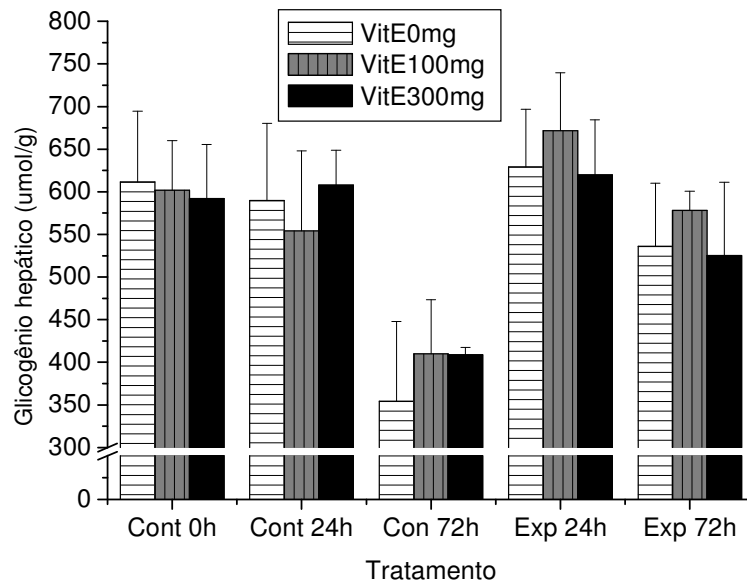


Figura 72. Glicogênio hepático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

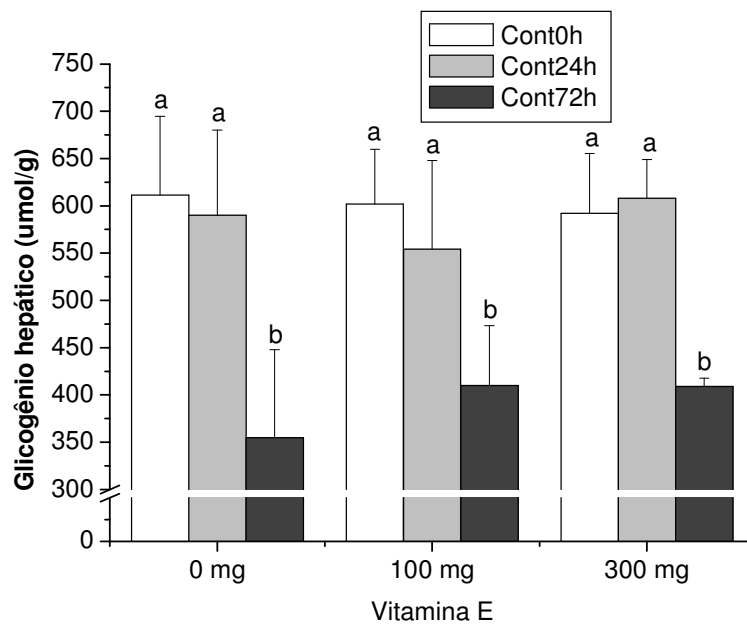


Figura 73. Glicogênio hepático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

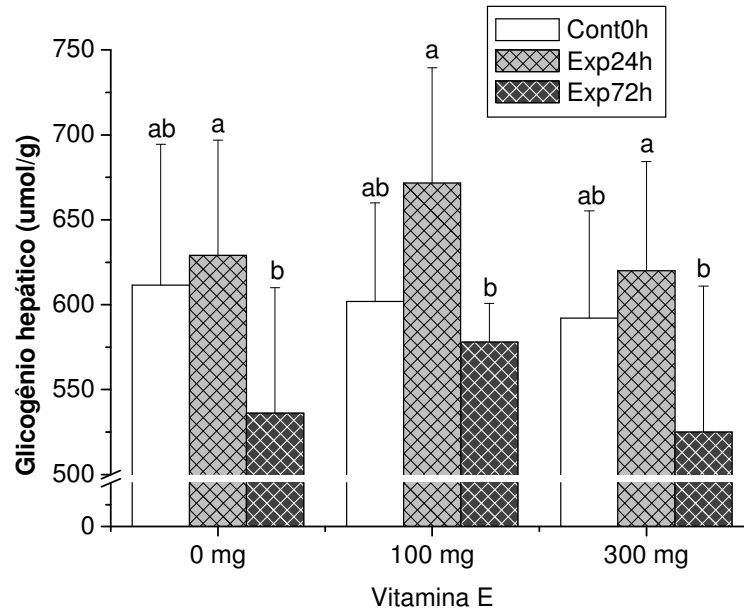
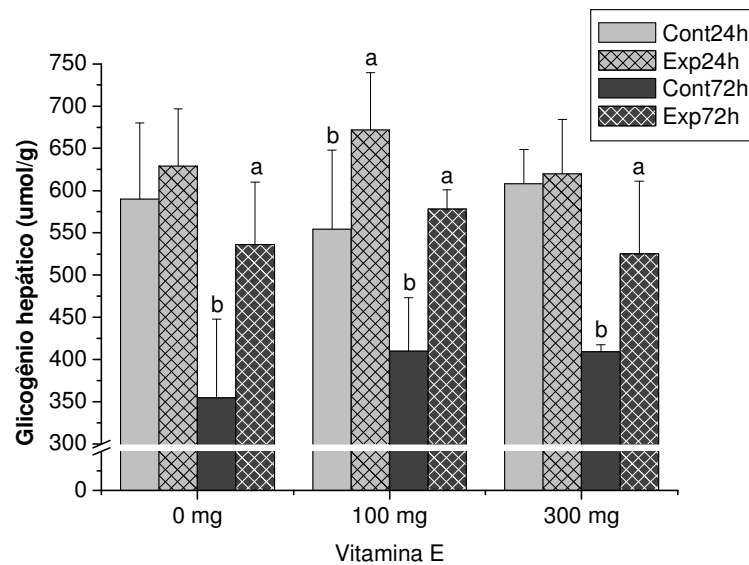


Figura 74. Glicogênio hepático de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Glicogênio Muscular

O grupo controle apresentou concentração média de glicogênio muscular de 20,47 $\mu\text{mols/g}$ ($\pm 1,21$ $\mu\text{mols/g}$). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo controle. Estes grupos diferiram entre si, sendo que o grupo C0h-300mg apresentou o maior valor de glicogênio muscular (Figura 75). Observou-se aumento do glicogênio muscular nos grupos E24h-0mg, C72h-0mg e E72h-0mg, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 76 e 77). Os animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E apresentaram aumento de glicogênio muscular nos grupos E24h, C72h e E72h, comparados ao grupo C0h-100mg (Figuras 76 e 77). Já os animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E apresentaram aumento de glicogênio muscular nos grupos C24h e E24h, comparados ao grupo C0h-300mg (Figuras 76 e 77). Os grupos E24h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 75). O mesmo foi observado para os grupos E72h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E (Figura 75). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos E24h e E72h diferiram entre si (Figura 77). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos peixes alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figura 78). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos animais alimentados com dieta não suplementada (Figura 78).

Figura 75. Glicogênio muscular de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

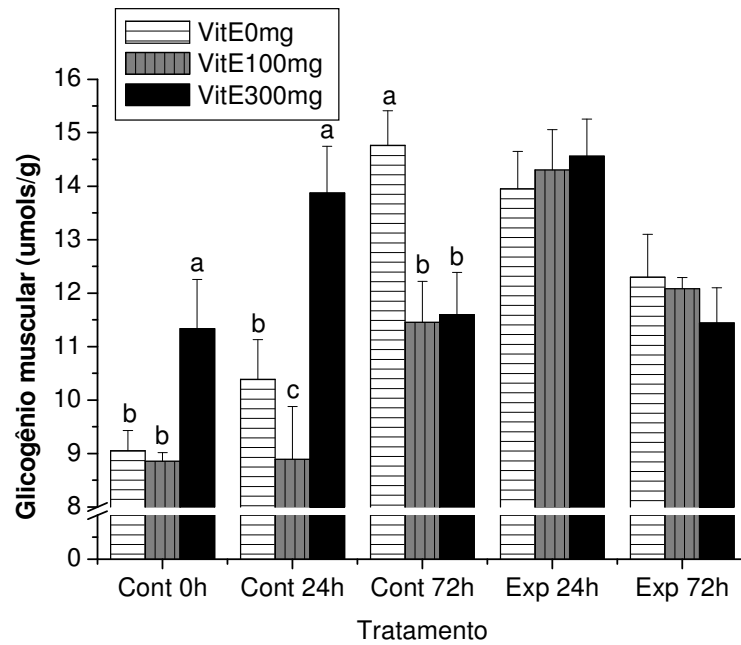


Figura 76. Glicogênio muscular de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

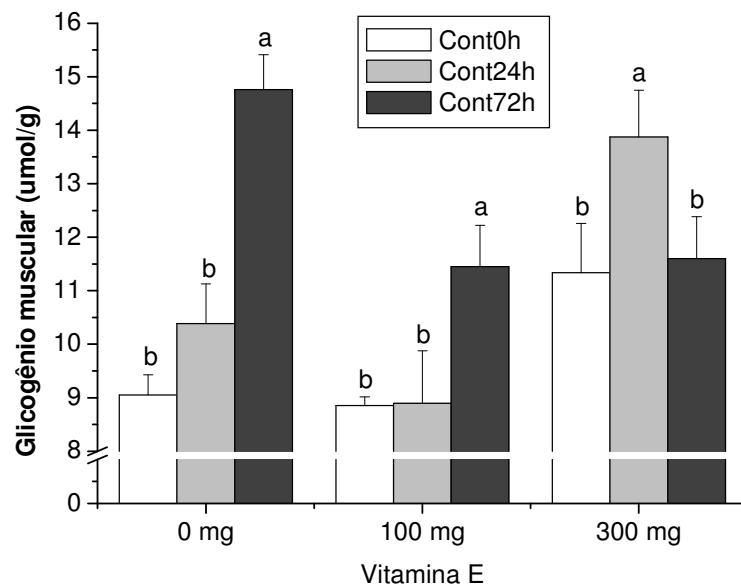


Figura 77. Glicogênio muscular de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

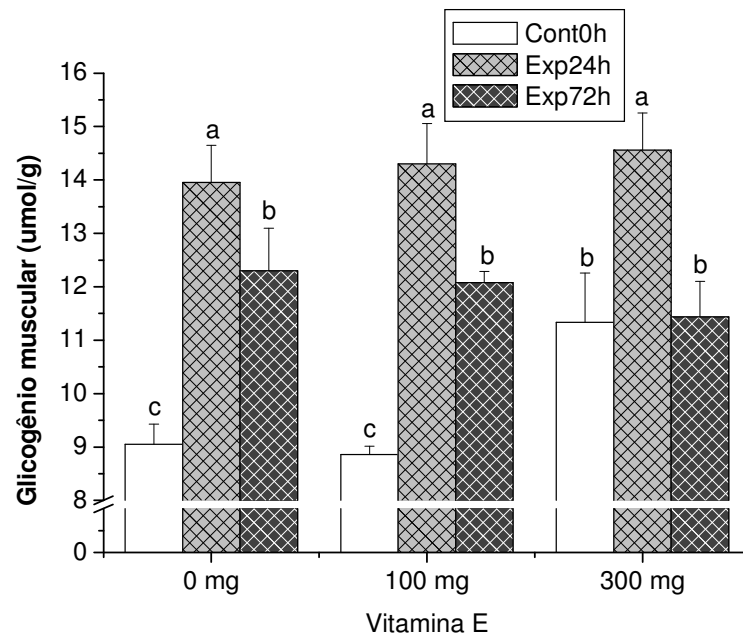
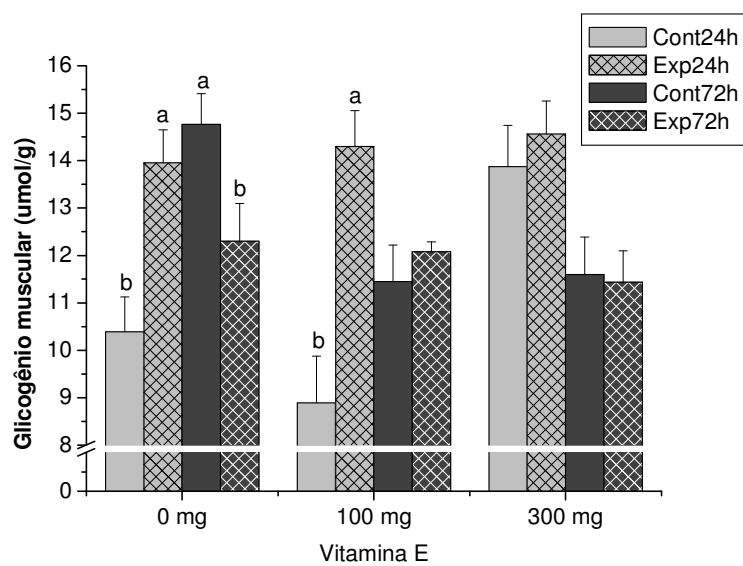


Figura 78. Glicogênio muscular de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



5.4. Resposta imune inata

Leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos)

O grupo controle apresentou porcentagem média de leucócitos mononucleares de 89,9% ($\pm 2,56\%$). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo controle. Estes grupos diferiram entre si, sendo que o grupo C0h-100mg apresentou a menor porcentagem de leucócitos mononucleares (Figura 79). Os grupos C24h-0mg, E24h-0mg, C72h-0mg e E72h-0mg apresentaram redução na porcentagem de leucócitos mononucleares, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 80 e 81). O mesmo resultado foi observado nos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figuras 80 e 81). Já nos peixes alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, apenas os grupos C24h, E24h e E72h apresentaram valores reduzidos de leucócitos mononucleares, comparados ao grupo C0h (Figuras 80 e 81). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-100mg apresentou a menor porcentagem de leucócitos mononucleares (Figura 79). Já os grupos E72h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 79). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C24h e E24h diferiram entre si, bem como os grupos C72h e E72h (Figura 82).

Figura 79. Leucócitos mononucleares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

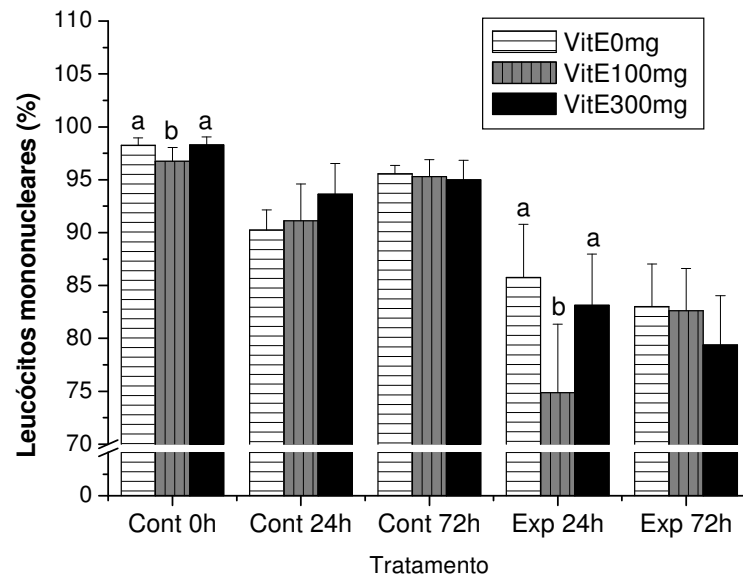


Figura 80. Leucócitos mononucleares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

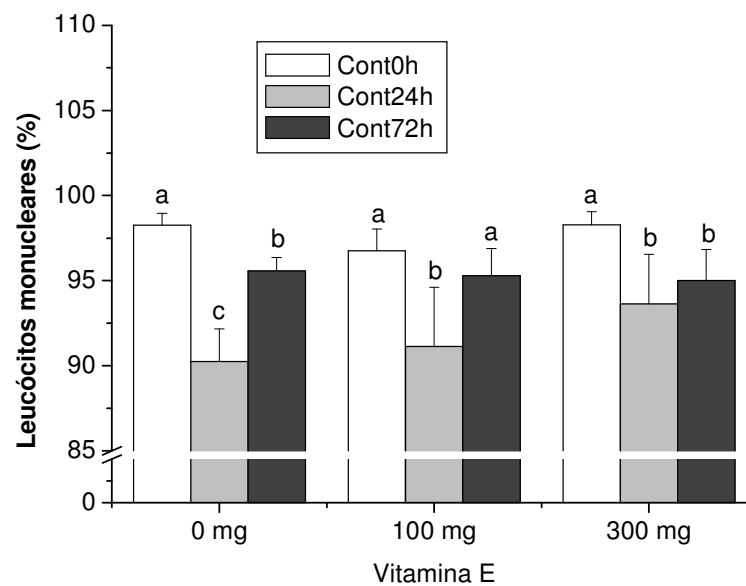


Figura 81. Leucócitos mononucleares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

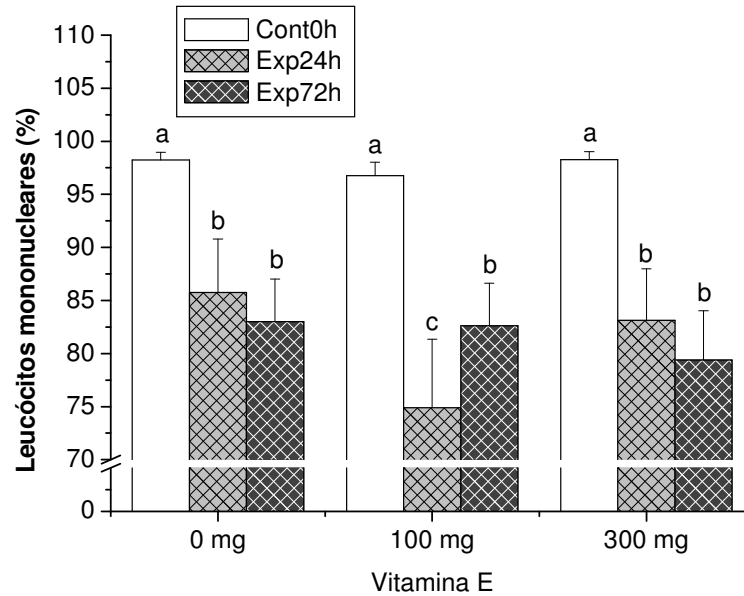
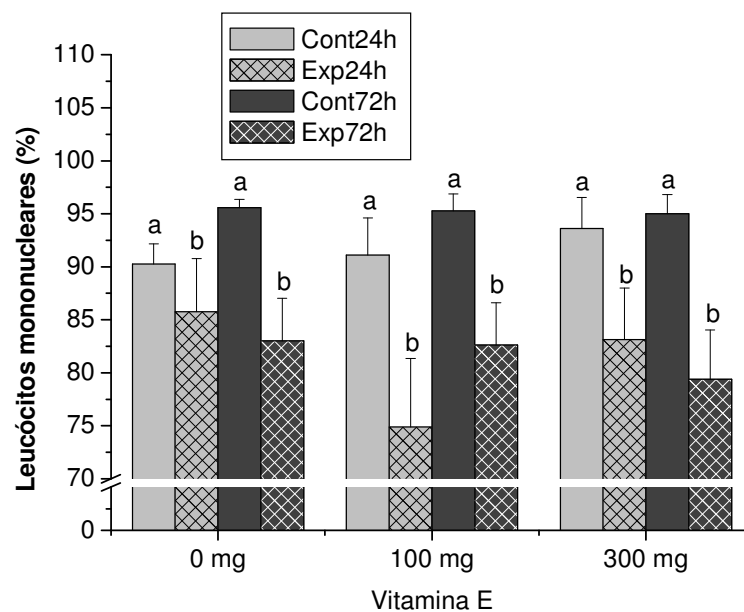


Figura 82. Leucócitos mononucleares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Leucócitos granulares (neutrófilos, eosinófilos, célula granulocítica especial - CGE)

O grupo controle apresentou porcentagem média de leucócitos granulares de 11,1% ($\pm 2,56\%$). Os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo controle. Estes grupos diferiram entre si, sendo que o grupo C0h-100mg apresentou a maior porcentagem de leucócitos granulares (Figura 83). Os grupos C24h-0mg, E24h-0mg, C72h-0mg e E72h-0mg apresentaram aumento na porcentagem de leucócitos granulares, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 84 e 85). O mesmo resultado foi observado nos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figuras 84 e 85). Já nos peixes alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, apenas os grupos C24h, E24h e E72h apresentaram valores aumentados de leucócitos granulares, comparados ao grupo C0h (Figuras 84 e 85). Comparando-se os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E entre si, o grupo E24h-100mg apresentou a maior porcentagem de leucócitos granulares (Figura 83). Já os grupos E72h alimentados com os três níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 83). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos C24h e E24h diferiram entre si, bem como os grupos C72h e E72h (Figura 86).

Figura 83. Leucócitos granulares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

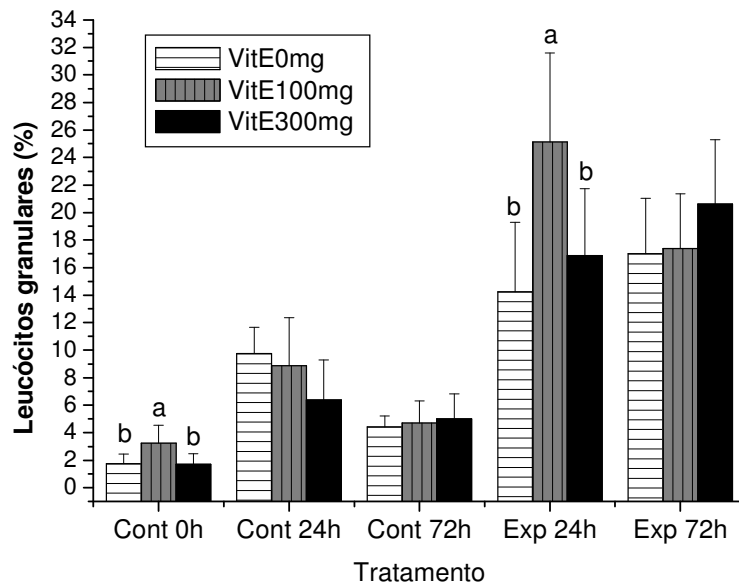


Figura 84. Leucócitos granulares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

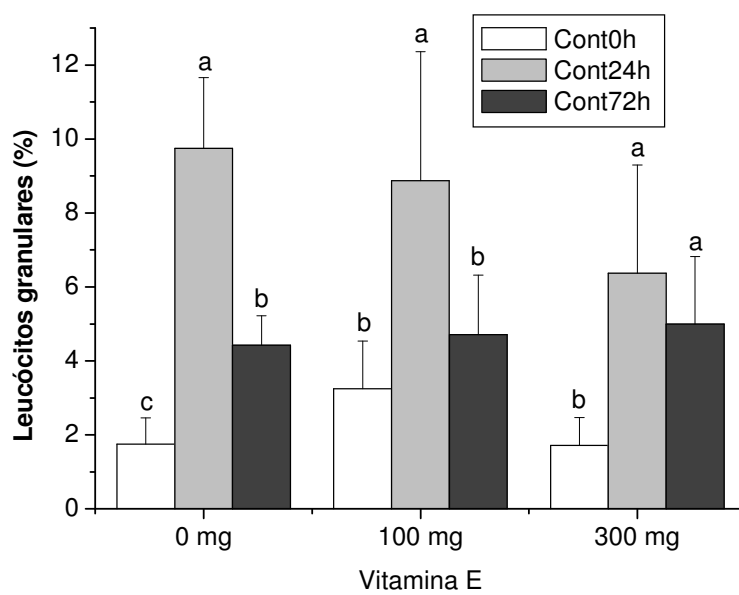


Figura 85. Leucócitos granulares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

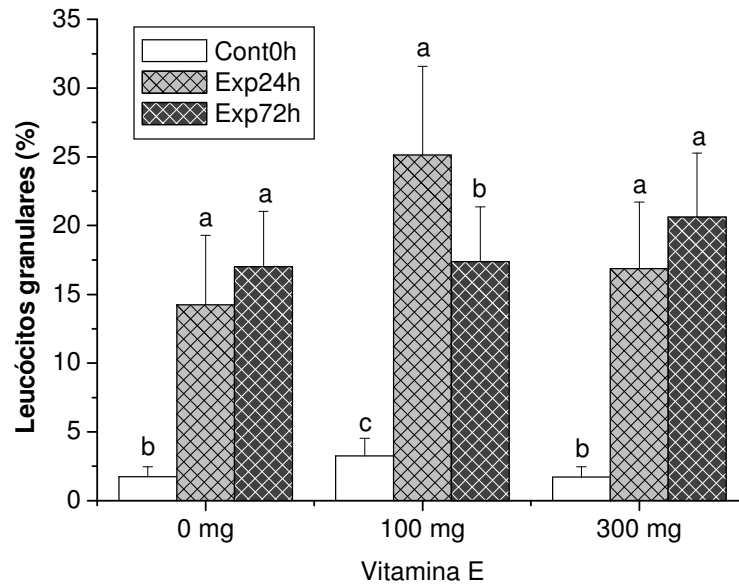
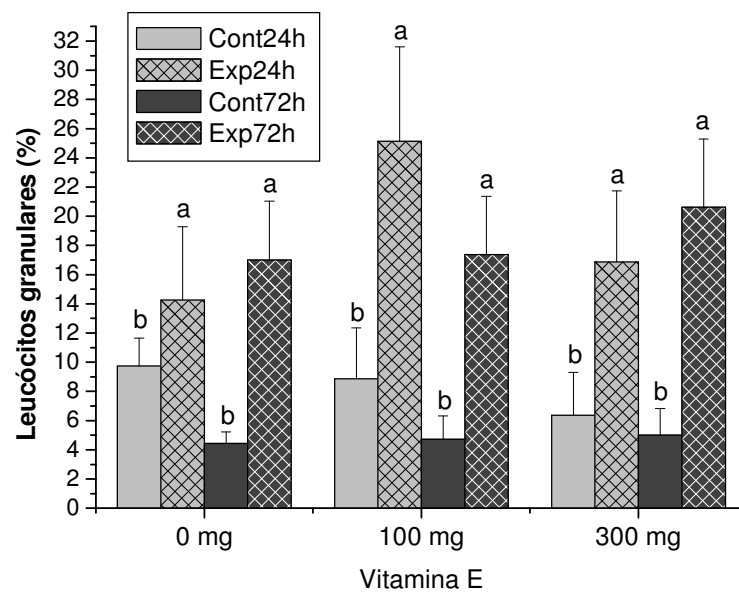


Figura 86. Leucócitos granulares de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Lisozima sérica

O grupo controle apresentou concentração média de lisozima sérica de 10,41 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm 3,43 \mu\text{g/mL}$), valor este que não diferiu significativamente dos valores médios dos grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg, que também não diferiram entre si (Figura 87). Houve redução significativa na concentração de lisozima sérica nos animais do grupo E24h-0mg, comparado ao grupo C0h-0mg (Figura 89). Nos peixes alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, houve diminuição no nível de lisozima sérica no grupo E24h e aumento no grupo E72h, comparados ao grupo C0h (Figura 89). Foi observado aumento na concentração de lisozima sérica do grupo C72h-300mg, comparado ao grupo C0h-300mg (Figura 88). Os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 87). Já se comparando os grupos E72h alimentados com os três níveis de vitamina E, o grupo E72h-100mg apresentou a maior concentração de lisozima sérica (Figura 87). Em todos os níveis de vitamina E, os grupos E24h e E72h diferiram entre si (Figura 89), enquanto que os grupos C24h e E24h não (Figura 90). Os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos peixes alimentados com ambas as dietas suplementadas (Figura 90).

Figura 87. Lisozima sérica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

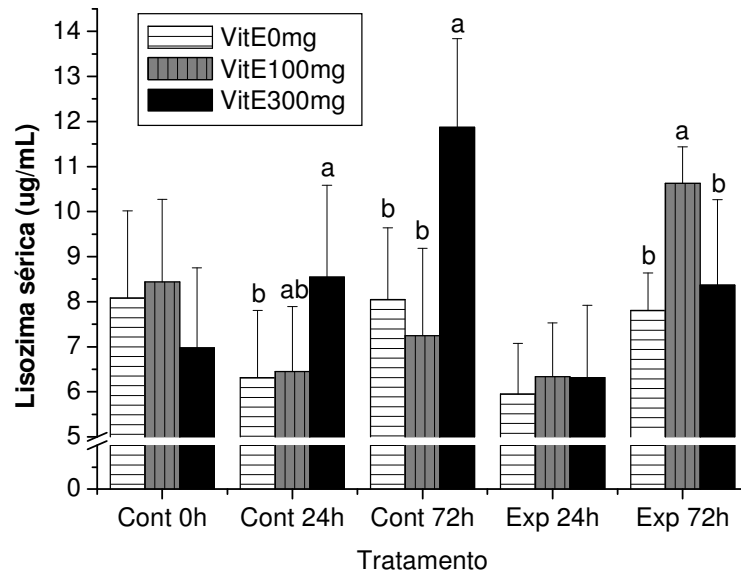


Figura 88. Lisozima sérica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

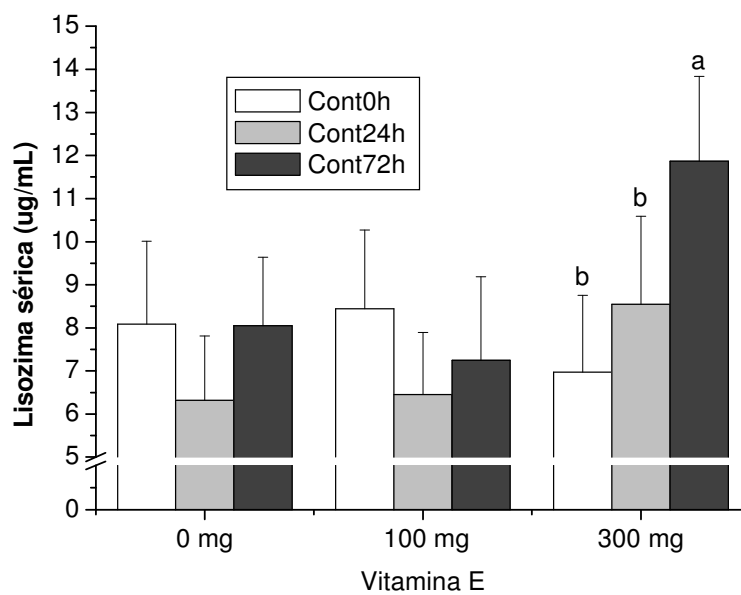


Figura 89. Lizozima sérica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

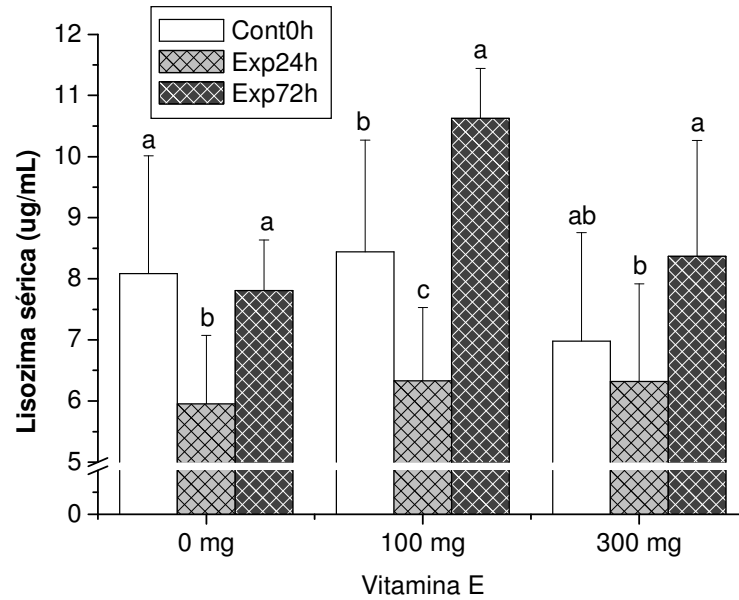
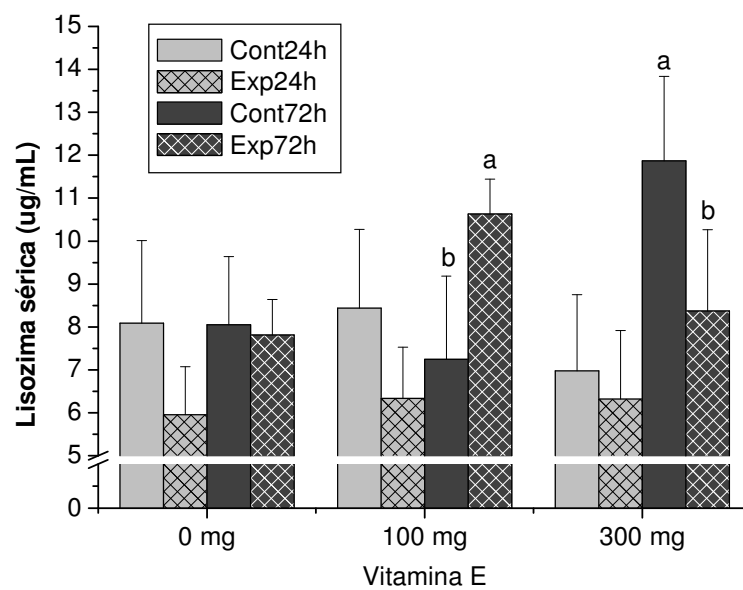


Figura 90. Lizozima sérica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Atividade hemolítica do sistema complemento

O grupo controle apresentou variação média de densidade óptica (DO) de 0,66 ($\pm 0,11$), valor este que diferiu significativamente apenas do valor médio do grupo C0h-300mg. Comparando-se os grupos C0h-0mg, C0h-100mg e C0h-300mg entre si, observa-se a menor atividade hemolítica no grupo C0h-300mg (Figura 91). Os grupos C24h-0mg, E24h-0mg, C72h-0mg e E72h-0mg apresentaram redução na atividade hemolítica, comparados ao grupo C0h-0mg (Figuras 92 e 93). Nos peixes alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, houve uma redução na atividade hemolítica apenas no grupo E24h, comparado ao grupo C0h-100mg (Figura 93). Já nos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E, houve redução na atividade hemolítica dos grupos C72h e E72h, comparados ao grupo C0h (Figuras 92 e 93). Os grupos E24h alimentados com os diferentes níveis de vitamina E não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 91). Já se comparando os grupos E72h alimentados com os três níveis de vitamina E, o grupo E72h-100mg apresentou a maior atividade hemolítica (Figura 91). Diferenças significativas entre os grupos E24h e E72h foram observadas nos animais alimentados com ambas as dietas suplementadas com vitamina E (Figura 93). Os grupos C24h e E24h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos peixes alimentados com a dieta suplementada com 100 mg de vitamina E (Figura 94). Já os grupos C72h e E72h quando comparados, apresentaram diferença apenas nos peixes alimentados com a dieta suplementada com 300 mg de vitamina E (Figura 94).

Figura 91. Atividade hemolítica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre os diferentes níveis de vitamina E em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

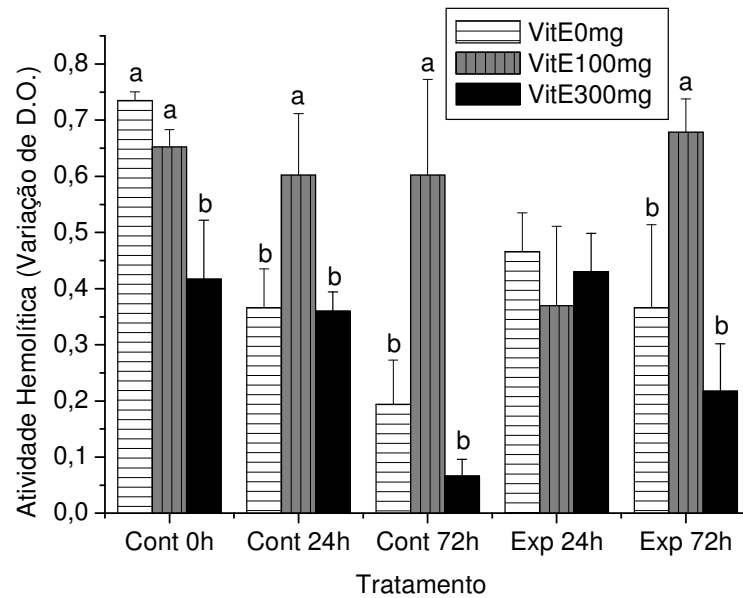


Figura 92. Atividade hemolítica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E. Comparação entre controles 0, 24 e 72h em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

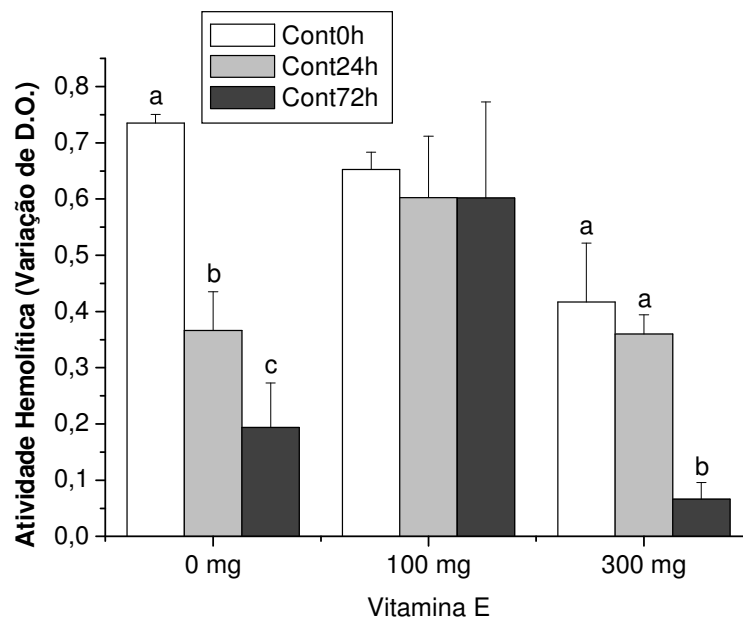


Figura 93. Atividade hemolítica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimentais 24 e 72h em cada nível de vitamina E e entre estes e seu respectivo C0h. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

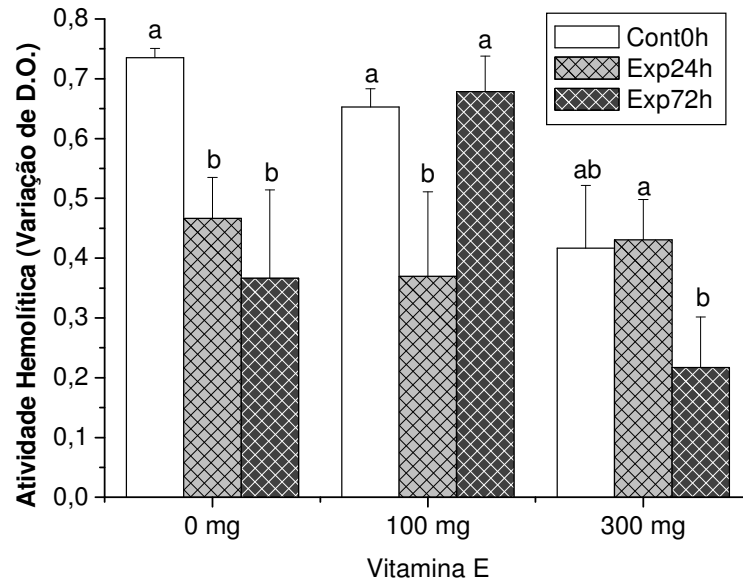
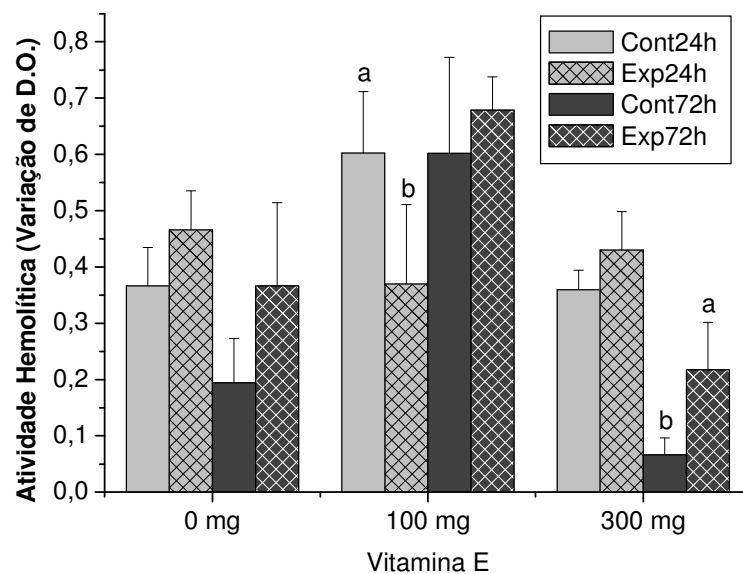


Figura 94. Atividade hemolítica de pacus alimentados com diferentes níveis de vitamina E e submetidos à variação de temperatura. Comparação entre experimental e seu respectivo controle em cada nível de vitamina E. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



6. DISCUSSÃO

Como os estressores na aquicultura são inevitáveis, reduzir os efeitos deletérios do estresse é um objetivo fundamental para o sucesso na produção em cativeiro (ASHLEY et al., 2007). A modulação da imunidade pela dieta tem sido apontada como um método de melhorar a imunocompetência para neutralizar os efeitos de vários estressores (PULSFORD et al., 1995) e, por isso, tem se tornado objeto importante de estudo.

6.1. Cortisol

O desenvolvimento de práticas de criação que reduzam o estresse e seus potenciais efeitos prejudiciais na produção de pescado é um objetivo comum a todos os piscicultores. Os estressores que parecem insignificantes, como por exemplo, o transporte, o manuseio e a temperatura a que os animais estão submetidos, podem ter efeito cumulativo em longo prazo na saúde dos peixes (SCHRECK, 2000).

O estresse em peixes ocorre sempre que houver mudanças bruscas na temperatura e na qualidade da água, ainda que as variações estejam dentro da faixa de tolerância da espécie e, definitivamente, quando estão fora desta faixa (WEDEMEYER, 1997). Sabe-se que a temperatura tem um efeito profundo na resposta dos peixes ao manuseio (CONTE, 2004). Segundo Barton e Iwama (1991), em peixes a resposta ao estresse é uma reação a um estímulo que altera sua homeostase. Nos teleósteos, a elevação da quantidade de cortisol plasmático é a principal resposta hormonal ao estresse (BARCELLOS et al., 2000).

No presente estudo apenas o cortisol plasmático foi mensurado. Observou-se aumento deste hormônio nos animais submetidos à variação de temperatura durante 24h (grupos E24h-0mg, E24h-100mg e E24h-300mg), havendo retorno aos valores basais após 72h nessa condição (grupos E72h-0mg, E72h-100mg e E72h-300mg). Isto indica que a variação de temperatura atuou como um estressor para os pacus, que após 72h pareceram apresentar um quadro de adaptação à situação imposta. A ausência de diferença entre os grupos alimentados com as diferentes concentrações de vitamina E, indicam que essa vitamina parece não influenciar a liberação desse hormônio nessa condição (variação de temperatura). O único grupo controle (animais que foram apenas manuseados) que apresentou aumento na concentração plasmática de cortisol foi o alimentado com

dieta não suplementada com vitamina E, sendo que este aumento foi verificado apenas 72h após a aplicação do estressor (manuseio) (grupo C72h-0mg).

O cortisol é um glicocorticóide, derivado do colesterol, que tem função, dentre outras, de sustentar altos níveis de glicose plasmática após a resposta inicial provocada pelas catecolaminas, devido ao fato de estimular a neoglicogênese e regular a demanda de glicose nos tecidos periféricos. Desse modo, o aumento da concentração de cortisol plasmático é acompanhado pelo aumento da concentração plasmática de glicose (MOMMSEN et al., 1999).

O cortisol, direta ou indiretamente, tem um papel importante no metabolismo intermediário (VIJAYAN et al., 1994, 1996, 1997) e na regulação iônica e osmótica (MCCORMICK, 1995), as quais apontam para uma função adaptativa deste hormônio durante o estresse em peixes. Vale ressaltar que a quantificação do cortisol é, muitas vezes, economicamente inviável em atividades de piscicultura, de forma que a medida das flutuações de glicose plasmática ao invés dos níveis de cortisol tem se tornado uma das técnicas mais usadas para monitorar estresse em peixes (PICKERING; POTTINGER, 1989; BARTON; IWAMA, 1991; ABREU et al., 2009; GONÇALVEZ et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2006), especialmente o estresse agudo, visto que retornam aos níveis basais em 24 horas (ABREU et al., 2009; PICKERING; POTTINGER et al., 1989).

Outros hormônios liberados em resposta a um estressor são as catecolaminas, adrenalina e noradrenalina. Um dos principais papéis desses hormônios é modular as funções cardiovasculares e respiratórias, a fim de manter os níveis de oxigênio no sangue adequados e, portanto, um suprimento suficiente para os tecidos. A magnitude da elevação dos níveis de catecolaminas plasmáticas varia dependendo do tipo e da gravidade do estressor, bem como da espécie em questão (REID et al., 1998).

É importante ressaltar que a liberação de catecolaminas na corrente sanguínea é muito rápida, o que dificulta a utilização destes hormônios como ferramenta para se avaliar o estresse (PORTZ et al., 2006). Entretanto, a liberação de catecolaminas provoca o primeiro aumento de glicose plasmática e influencia diretamente na osmorregulação, promovendo aumento das trocas iônicas através das brânquias (MAYER-GOSTAN et al., 1987). Assim, as alterações nos níveis de glicose e íons plasmáticos podem ser indicativas da liberação de catecolaminas na corrente sanguínea, bem como da liberação de cortisol.

6.2. Desempenho

Alguns estudos sobre a suplementação da dieta com vitamina E mostraram que este micronutriente, além de melhorar a resposta imune inata dos animais, também pode apresentar efeitos positivos no crescimento dos peixes (AMLASHI et al., 2011; SAU et al., 2004). Sado (2008) relatou que a vitamina E é um nutriente essencial para a obtenção de crescimento adequado e manutenção dos parâmetros hematológicos dentro dos valores normais para o pacu. Relatou ainda que a concentração de vitamina E na ração que resultou em melhor desempenho para a espécie foi de 87,2 mg/Kg. No presente estudo, após 45 dias de alimentação dos animais com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina E, não foi observada diferença significativa entre os grupos para nenhuma das variáveis de desempenho analisadas, embora os animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E tenham mostrado uma tendência de aumento destes parâmetros. A ausência de diferença significativa entre os grupos pode ser explicada pelo fato de o período de alimentação dos animais ter sido de 45 dias. Os estudos que relataram diferenças nas taxas de crescimento entre os animais alimentados com diferentes concentrações de vitamina E dietética foram conduzidos por períodos iguais ou superiores a 8 semanas (AMLASHI et al., 2011; SAU et al., 2004). Porém, Huang e colaboradores (2004) estudando os efeitos dos níveis dietários de vitamina E por 10 semanas no salmonídeo *Oncorhynchus kitsutch*, também não observaram diferenças significativas no crescimento entre os grupos alimentados com as diferentes dietas. Isto nos mostra que o tempo em que a dieta é oferecida aos animais não é o único fator que influencia o crescimento, dependendo este também das características fisiológicas de cada espécie. Além disso, o crescimento é influenciado principalmente pelos macronutrientes da dieta e as vitaminas são micronutrientes.

Nos sistemas intensivos de produção, pelo fato da dieta artificial ser a principal fonte de alimento, a própria dieta oferecida pode ser um fator estressor para os animais. A ocorrência de desbalanços ou deficiências nutricionais ocasionadas por dietas mal formuladas podem prejudicar o crescimento e diminuir a resistência a doenças. Dessa forma, há uma menor produtividade e, conseqüentemente, um menor retorno econômico (SADO, 2008).

O estabelecimento das exigências nutricionais dos peixes de criação tem trazido benefícios para seu crescimento, eficiência alimentar e sobrevivência.

Cada vez mais, tem-se buscado o conhecimento dos efeitos dos nutrientes da dieta sobre a saúde dos animais e o uso de imunostimulantes, como as vitaminas, tem sido apontado com uma alternativa para maximizar a proteção dos peixes em situações de estresse, reduzindo a ocorrência de surtos de doenças (CHAGAS et al., 2009).

6.3. Hematologia

O valor do hematócrito representa o volume total das hemácias no sangue. Essa relação determina sua quantidade de forma relativa. No presente estudo observou-se aumento do hematócrito tanto nos animais que foram somente manuseados (grupos C24h e C72h) quanto nos animais que foram submetidos também à variação de temperatura (grupos E24h e E72h). Nos grupos E24h, C72h e E72h houve diferença entre os peixes alimentados com as diferentes concentrações de vitamina E (0, 100 e 300 mg), sendo que os animais alimentados com a dieta suplementada com 100 mg apresentaram alterações menores. Isto corrobora a observação de Sado (2008) sobre o papel da vitamina E na manutenção dos parâmetros hematológicos normais para o pacu. Em flatfish alimentado com dietas deficientes em vitamina E observa-se valores de hematócrito aumentados (PULSFORD et al., 1995).

Com relação à concentração de hemoglobina total observou-se aumento nos grupos E24h em todos os níveis de vitamina E (grupos E24h-0mg, E24h-100mg e E24h-300mg). Este aumento pode ser uma adaptação para melhorar o aporte de oxigênio nos tecidos, a fim de suprir a demanda energética imposta pelo estresse térmico. Somente no grupo de animais alimentados com dieta não suplementada ocorreu redução da hemoglobina 72h após o manuseio e a exposição à variação de temperatura (grupos C72h-0mg e E72-0mg). Não houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes concentrações de vitamina E, de forma que essa vitamina parece não influenciar na concentração de hemoglobina nessa condição (variação de temperatura).

Os glóbulos vermelhos têm também a função de transportar oxigênio e gás carbônico. No presente trabalho, observou-se ainda aumento no número de células vermelhas nos grupos E24h em todas as dietas (grupos E24h-0mg, E24h-100mg e E24h-300mg), os quais se mantiveram altos após 72h sob variação de

temperatura (grupos E72h-0mg, E72h-100mg e E72h-300mg). O único grupo controle (animais que foram apenas manuseados) a apresentar aumento no número de glóbulos vermelhos foi o de peixes alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, sendo que este aumento foi verificado apenas 72h após o manuseio (grupo C72h-100mg). Nos grupos C24h, C72h e E24h houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes dietas (0, 100 e 300 mg de vitamina E/kg), sugerindo a importância desta vitamina na modulação positiva da eritropoiese. Garcia e colaboradores (2007) também observaram aumento no número de eritrócitos em pacus alimentados com dietas suplementadas com vitamina C e E e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. Wojtaszek e colaboradores (2002) estudando os efeitos hematológicos de altas concentrações de cortisol na carpa comum relataram uma tendência de aumento dos valores de hematócrito e hemoglobina e do número de células vermelhas. Estes autores propõem que o aumento no número de células vermelhas possa ser devido à rápida diferenciação e proliferação dos eritrócitos causada pelo estímulo do cortisol ou devido à contração esplênica provocada pelo aumento das catecolaminas na circulação frente ao estímulo por um estressor.

A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e células vermelhas foi possível calcular os índices hematimétricos. O volume corpuscular médio (VCM) representa a média dos volumes dos eritrócitos na amostra de sangue. Nos grupos de animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E e que foram apenas manuseados foi observado aumento do VCM 72h após o manuseio (grupos C72-0mg e C72h-300mg). Porém, nos animais alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg que foram também submetidos à variação de temperatura houve redução do VCM em 24h (grupos E24-0mg e E24h-300mg). Isto também foi observado nos animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, porém apenas 72h após serem submetidos a tais condições (grupos E72h-100mg). Nos grupos E24h, C72h e E72h houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes concentrações de vitamina E (0, 100 e 300 mg), sendo que, mais uma vez, os animais alimentados com a dieta suplementada com 100 mg apresentaram menos alterações. Junior e colaboradores (2010) observaram que o volume corpuscular médio em tilápias-do-Nilo também se altera em função do nível de

colina, sendo que a ausência de suplementação e a suplementação de 1.000 mg colina/kg de ração resultam na liberação de células com maior volume.

A hemoglobina corpuscular média (HCM) indica a quantidade de hemoglobina presente nos eritrócitos e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) representa a concentração de hemoglobina em um eritrócito. Foi observada diminuição da HCM nos grupos E72h em todas as dietas (grupos E72h-0mg, E72h-100mg e E72h-300mg). Já nos grupos C72h tal redução foi observada apenas nos grupos de animais alimentados com ambas as dietas suplementadas (grupos C72h-100mg e C72h-300mg). Observou-se redução da CHCM nos grupos C72h e E72h em todas as dietas (grupos C72h-0mg, C72h-100mg e C72h-300mg; grupos E72h-0mg, E72h-100mg e E72h-300mg). Porém, houve aumento na CHCM nos animais alimentados com ambas as dietas suplementadas após 24h submetidos à variação de temperatura (grupos E24h-100mg e E24h-300mg). Não houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes concentrações de vitamina E. Junior e colaboradores (2010) descreveram queda na taxa de hemoglobina, no volume da célula e na CHCM em tilápias nilóticas submetidas ao frio. Andrade e colaboradores (2007) também observaram aumento da concentração de hemoglobina e da HCM em pirarucu alimentado com dietas suplementadas com vitamina E.

A hematologia é bastante utilizada como ferramenta para se avaliar o estado de saúde animal dado pela avaliação dos elementos figurados do sangue. O sangue é um tecido líquido, móvel, que está em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos, constituindo uma das grandes forças homeostáticas do organismo. Ele distribui calor, transporta gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo (JUNIOR et al., 2010). Desse modo, alterações nos valores de hematócrito, hemoglobina e número de células vermelhas têm sido amplamente utilizadas como indicadores dos efeitos e gravidade de vários tipos de estressores em peixes, bem como indicador do efeito de imunoestimulantes (GARCIA et al., 2007; JUNIOR et al., 2010; PULSFORD et al., 1995; SADO, 2008; SIGNOR et al., 2010; WOJTASZEK et al., 2002)

Os peixes respondem fisiologicamente às alterações de oxigênio na água, como forma de adaptação a esse ambiente (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Dessa forma, a alteração das variáveis hematológicas pode ocorrer como estratégia para melhorar o transporte de oxigênio no sangue durante os períodos de desafio metabólico (MONTERO et al., 1999).

6.4. Metabolismo intermediário

Estressores químicos, físicos e biológicos podem provocar respostas não-específicas em peixes, que são consideradas adaptativas por capacitarem o animal a lidar com os distúrbios e manter sua homeostase (BARTON, 2002). Considerando-se que o metabolismo dos peixes sofre influência direta da temperatura da água, esse fator tem sido considerado como o principal agente estressor quando fora da faixa de conforto para a espécie (JUNIOR et al., 2010).

Um estudo feito anteriormente com pacu indica que a concentração plasmática de cortisol é crescente 0, 1 e 6 horas após o estresse agudo (KRIEGER-AZZOLINI et al., 1989). No presente estudo, as maiores concentrações plasmáticas de cortisol foram observadas 24h após o manuseio e permanência sob variação de temperatura, havendo retorno aos valores basais após 72h sob essa condição. Isto sinaliza para uma possível adaptação à situação imposta.

Embora se tenha descrito que a concentração plasmática de glicose acompanha o aumento dos níveis plasmáticos das catecolaminas e do cortisol, observou-se tal efeito apenas nos animais alimentados com dieta sem suplementação com vitamina E e expostos à variação de temperatura. Este aumento é observado a partir de 24h da transferência dos peixes para os tanques sem controle de temperatura e se mantém após 72h nessa condição (grupos E24h-0mg e E72h-0mg). Em contrapartida, nos peixes alimentados com ambas as dietas suplementadas com vitamina E (100 e 300 mg) observou-se redução da concentração plasmática de glicose nos grupos apenas manuseados, 72h após o manuseio (C72h-100mg e C72h-300mg). As diferentes concentrações de vitamina E parecem influenciar a concentração plasmática de glicose, visto que após 45 dias de alimentação com diferentes teores dessa vitamina e antes de serem submetidos a qualquer estressor (manuseio ou variação de temperatura), os peixes que não receberam suplementação apresentaram menor concentração de glicose plasmática comparado aos peixes que receberam dietas suplementadas com 100 ou 300 mg de vitamina E.

Situações de estresse em peixes podem causar ainda demanda energética maior com conseqüente aumento da demanda de oxigênio. Esse fato leva a um aumento do metabolismo anaeróbico para a viabilização dos processos vitais. Esse desvio metabólico é notado através do aumento dos teores de lactato plasmático, que pode ser um bom indicador de intensidade de estresse (HOCHACHKA, 1980). No presente estudo, observou-se aumento da concentração de lactato plasmático nos pacus alimentados com dieta sem suplementação e com suplementação de 300 mg de vitamina E submetidos à variação de temperatura por 24h (grupos E24h-0mg e E24h-300mg). Tal aumento também foi observado nos grupos de animais apenas manuseados e alimentados com dieta sem suplementação e com suplementação de 300 mg de vitamina, 72h após o manuseio (grupos C72h-0mg e C72h-300mg). Nos grupos C24h e E24h houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes dietas (0, 100 e 300 mg), sendo os menores valores apresentados pelos animais alimentados com a dieta suplementada com 100 mg de vitamina E. Tal fato sugere papel mitigador de um dos principais efeitos do estresse (aumento de lactato plasmático) exercido pela concentração mais adequada de vitamina E. Tanck e colaboradores (2000), estudando carpas comuns submetidas a quedas bruscas de temperatura, observaram diminuição da concentração de lactato plasmático e não relataram alterações na concentração plasmática de glicose, resultados também observados no presente estudo nos animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg e submetidos à variação de temperatura por 24h (E24h-100mg).

Para confirmar o aumento do metabolismo anaeróbio é preciso considerar também os dados de piruvato plasmático. Neste estudo observou-se aumento da concentração plasmática de piruvato nos grupos C72h e E72h em todas as dietas (grupos C72-0mg, C72h-100mg e C72h-300mg; grupos E72h-0mg, E72h-100mg e E72h-300mg). O mesmo foi observado nos animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E e apenas manuseados, após 24h do manuseio (C24h-100mg). Porém, houve redução da concentração plasmática de piruvato nos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E e apenas manuseados, após 24h do manuseio (C24h-300mg). Nos grupos C24h e C72h houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes dietas (0, 100 e 300 mg). A partir dos dados de lactato e piruvato plasmático pudemos calcular a razão lactato/piruvato, a qual permite inferir se, de fato, houve aumento da

preferência anaeróbia para suprir a demanda energética imposta pelo estressor. Tal relação apresentou-se aumentada somente nos pacus alimentados com dieta sem suplementação e com suplementação de 300 mg de vitamina E submetidos à variação de temperatura por 24h, indicando que nestes grupos houve menor eficiência metabólica com aumento da suplementação energética pelas vias anaeróbias. Isto reforça a hipótese de que a suplementação com 100 mg de vitamina E parece ter mitigado o estresse, de forma que os peixes alimentados com esta dieta utilizaram menos as vias anaeróbicas para suprir a demanda energética imposta pela variação de temperatura.

O aumento da demanda energética pode ser ainda confirmado pela queda das reservas de glicogênio hepático. Houve redução dessa importante reserva apenas nos animais que foram apenas manuseados, em todas as dietas, 72h após o manuseio (grupos C72h-0mg, C72h-100mg e C72h-300mg). Tal resultado pode ser explicado pelo fato de os pacus estarem em jejum durante esse período de 72h, o que pode ter levado ao consumo da reserva de glicogênio hepático para a manutenção da glicemia. Sabe-se que o estado nutricional dos peixes pode modular a resposta do glicogênio hepático ao cortisol (VIJAYAN et al. 1993). O mesmo não ocorre nos grupos de animais submetidos à variação de temperatura, provavelmente porque baixas temperaturas reduzem a taxa metabólica, diminuindo, conseqüentemente, a demanda energética. Ou ainda as fontes neoglicogênicas foram capazes de suprir essa demanda. Um estudo anterior mostra que o tratamento com cortisol aumenta significativamente a atividade de todas as enzimas gliconeogênicas chave, tais como fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose 1,6-bifosfato fosfatase e glicose 6-fosfato fosfatase (VIJAYAN et al. 1993).

Ao contrário da reserva hepática, a reserva glicogênica muscular apresentou aumento nos animais apenas manuseados, em todas as dietas, 72h após o manuseio (grupos C72h-0mg, C72h-100mg e C72h-300mg). O mesmo é observado nos grupos de peixes também submetidos à variação de temperatura, em todas as concentrações de vitamina E, 24h (grupos E24h-0mg, E24h-100mg e E24h-300mg) e 72h (grupos E72h-0mg, E72h-100mg e E72h-300mg) nessa condição. Nos grupos C0h, C24h e C72h houve diferença entre os animais dos grupos alimentados com as diferentes concentrações de vitamina E (0, 100 e 300 mg), sendo os maiores valores encontrados nos pacus alimentados com dieta suplementada com 300 mg

de vitamina E. É provável que esse aumento da reserva de glicogênio muscular seja devido à neoglicogênese a partir do metabolismo protéico (MOMMSEN et al., 1992; MOMMSEN et al., 1999), já que os níveis de aminoácidos livres plasmáticos apresentaram-se aumentados em quase todos os tratamentos. Os únicos grupos que não apresentaram alteração na concentração de aminoácidos livres plasmáticos foram o C24-0mg e o E72-0mg. Como proposto por Mommsen e colaboradores (1999), a proteólise periférica e o conseqüente aumento nos níveis plasmáticos de aminoácidos livres resultam em um aumento na disponibilidade de esqueletos carbônicos derivados de aminoácidos para oxidação ou rotas anabólicas como neoglicogênese ou glicogênese.

Sabe-se que em peixes o aumento das catecolaminas e do cortisol plasmático implica em aumento dos parâmetros cardíacos e respiratórios (IWAMA et al., 1997). Isso resulta em mudanças na capacidade de trocas através das brânquias (MOMMSEN et al., 1999), e conseqüentes desbalanceamentos eletrolíticos e da excreção nitrogenada (MCDONALD; MILLIGAN, 1997).

No presente estudo, observou-se redução da concentração plasmática de amônia nos animais alimentados com dieta não suplementada e suplementada com 100 mg de vitamina E após 24h e 72h de exposição à variação de temperatura (grupos E24h-0mg e E24h-100mg; grupos E72h-0mg e E72h-100mg). Tal resultado também foi observado nos animais alimentados com ambas as dietas suplementadas e apenas manuseados após 72h (C72h-100mg e C72h-300mg). Nos grupos C24h, E24h, C72h e E72h houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes dietas (0, 100 e 300 mg de vitamina E/kg). As alterações apresentadas pelos grupos de animais apenas manuseados mesmo não tendo havido o aumento da concentração de cortisol plasmático, tornam prováveis um aumento de catecolaminas na corrente sanguínea.

Em resposta a um estressor pode haver aumento de até 1000 vezes nos níveis de adrenalina, 200 vezes nos níveis de cortisol, 3 vezes nos níveis de glicose plasmática e 40 vezes no efluxo por difusão dos íons Na^+ e Cl^- (MCDONALD; MILLIGAN, 1992).

As brânquias são importantes órgãos-alvo do cortisol, o qual estimula o transporte iônico ativo, principalmente de Na^+ e Cl^- (MAYER-GOSTAN et al., 1987). Porém, o distúrbio nas concentrações plasmáticas de Na^+ e Cl^- é geralmente atribuído ao aumento nos níveis plasmáticos de adrenalina (MAZEAUD; MAZEAUD,

1981), os quais podem levar a um aumento do influxo de água e do efluxo difusional de eletrólitos através das brânquias com aumento da perda urinária de eletrólitos (MCDONALD; MILLIGAN, 1992), entre outros efeitos. Tal fato pode explicar as alterações na concentração plasmática de íons e proteína observadas no presente trabalho. O único grupo que não apresentou alteração na concentração de proteína plasmática foi o E24h-300mg. Os demais apresentaram aumento na concentração desta. Com relação ao sódio plasmático, os únicos grupos que não apresentaram alteração em sua concentração foram o E24-0mg, o C24h-100mg e o C24h-300mg. Os demais apresentaram redução. É possível ter havido um aumento do efluxo de sódio através das brânquias, com conseqüente perda de água e hemoconcentração, indicada pelo aumento da proteína plasmática. Porém, os dados de cloreto e potássio plasmático são controversos.

Observou-se aumento da concentração de cloreto plasmático tanto nos peixes somente manuseados (grupos controle) quanto nos também submetidos à variação de temperatura (grupos experimentais), alimentados com dieta não suplementada, após 24h nessa condição (grupos C24h-0mg, E24-0mg). Este aumento manteve-se nesses grupos mesmo após 72h (grupos C72h-0mg, E72-0mg). O mesmo resultado foi observado nos grupos de animais alimentados com dieta suplementada com 100 mg de vitamina E, porém apenas 24h submetidos a essa condição (grupos C24h-100mg e E24h-100mg), já que em 72h ocorreu diminuição da concentração de cloreto plasmático (grupos C72h-100mg e E72h-100mg). Tal diminuição também é observada nos peixes tanto somente manuseados (grupos controle) quanto nos também submetidos à variação de temperatura (grupos experimentais), alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E após 24h (grupos C24h-300mg e E24h-300mg) e 72h (grupos C72h-300mg e E72h-300mg) nessa condição. Sabe-se que a liberação contínua de adrenalina também pode causar a redução do efluxo difusional de eletrólitos (MCDONALD; MILLIGAN, 1997), o que poderia justificar, em parte, o aumento do cloreto plasmático em alguns grupos.

A concentração de potássio plasmático apresentou-se alterada (redução) apenas no grupo C72h-300mg. Nos demais grupos este parâmetro permaneceu inalterado. Abreu e colaboradores (2009), estudando os indicadores de estresse em pacus submetidos à captura, também não observaram alterações

significativas nos níveis plasmáticos de potássio, mesmo tendo havido aumento dos níveis plasmáticos de cortisol.

Donaldson e colaboradores (2008) descrevem que o choque térmico frio em peixes leva à falha na regulação osmótica, fazendo com que peixes de água doce percam íons. Para compensar esta perda de íons, a sua retomada pode ser aumentada pelo aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase ou pela diminuição da permeabilidade do epitélio branquial. Porém, sabe-se que baixas temperaturas reduzem a atividade da Na^+/K^+ -ATPase (MCCORMICK et al., 2000). Há evidências de que esta ATPase afete a atividade da anidrase carbônica branquial e renal, estando associada com a tomada de Na^+ e Cl^- em temperaturas que aumentam a depleção de eletrólitos.

Para um equilíbrio de cargas, diante do aumento da proteína e do cloreto plasmático, que possuem cargas negativas, e da redução do sódio plasmático, que possui carga positiva, o potássio deveria aumentar. Porém, tal fato não foi observado, levando à inferência de que deve ter havido a diminuição da reserva alcalina (bicarbonato), para possível equilíbrio das cargas. Esses dados permanecem sem explicação plausível dada a falta dos parâmetros bicarbonato e atividade da Na^+/K^+ -ATPase .

Dadas as diferenças apresentadas no balanço hidroeletrólítico entre os peixes alimentados com diferentes concentrações de vitamina E, sugere-se que esta vitamina tenha influência sobre a osmorregulação. Não é de nosso conhecimento qualquer estudo sobre os efeitos da suplementação vitamínica sobre a osmorregulação em peixes.

6.5. Resposta Imune Inata

O sistema imune inato dos peixes é dividido em barreiras físicas, celulares e componentes humorais. Estes últimos incluem inibidores de crescimento, várias enzimas líticas, como a lisozima, e componentes do sistema complemento, aglutininas, opsoninas, anticorpos naturais, citocinas, quimiocinas e peptídeos antibacterianos (ELLIS, 2001; HUNTINGFORD et al., 2006; MAGNADÓTTIR, 2006). Muitos fatores externos e internos podem influenciar a atividade dos parâmetros da imunidade inata. Sabe-se que mudanças de temperatura, manuseio e adensamento podem ter efeitos supressivos nesses parâmetros (ASHLEY et al., 2007), enquanto

que muitos aditivos dietéticos e imunostimulantes podem melhorar a atividade de diferentes fatores inatos (MAGNADÓTTIR, 2006; SIGNOR et al., 2010). O uso de imunostimulantes e de aditivos, bem como o balanceamento adequado dos nutrientes da dieta, além de possibilitar as respostas zootécnicas almejadas e a saúde dos peixes, permite que se obtenha maior resistência orgânica para superar a ação de agentes estressores, componentes inevitáveis sob as condições intensivas de criação (SIGNOR et al., 2010).

O sistema imune inato dos peixes é considerado a primeira linha de defesa contra um amplo espectro de patógenos e é mais importante para os peixes do que para os mamíferos, já que o sistema imune adaptativo dos peixes não é tão desenvolvido como o dos mamíferos (SAURABH; SAHOO, 2008).

Portanto, nos teleósteos a resistência a doenças é baseada principalmente no sistema imune inato (não-específico), cujos componentes destroem ou inativam organismos invasores, sem a necessidade de um contato anterior (HUNTINGFORD et al., 2006).

Demers e Bayne (1997) observaram que enquanto o estresse crônico é imunossupressivo, o estresse agudo pode favorecer os componentes celulares e humorais da defesa inata. O aumento destas, como opsonização, fagocitose e lise pode melhorar a capacidade do indivíduo de neutralizar potenciais microrganismos invasores e, assim, aumentar as chances de sobrevivência frente a uma injúria.

Quando o peixe não consegue escapar de um estressor ou quando o estímulo estressor se repete ou é intermitente, a ativação prolongada da resposta ao estresse tem efeitos deletérios (HUNTINGFORD et al., 2006). Estes incluem perda de apetite, crescimento reduzido, imunossupressão e reprodução prejudicada. Em peixes, o estresse crônico tem geralmente um efeito imunossupressivo, mediado particularmente pela ação do cortisol (WEYTS et al., 1999). A principal consequência é o aumento da mortalidade devido a infecções por fungos e bactérias (PICKERING; POTTINGER, 1989).

O tratamento de peixes com corticosteróides *in vivo* resultou na redução da proliferação de leucócitos (WEYTS et al., 1999). *In vitro* a adição de cortisol inibiu a proliferação de linfócitos (PULSFORD et al., 1995; TRIPP et al., 1987) e reduziu a produção de anticorpos (TRIPP et al., 1987).

A fim de monitorar o estado imune dos peixes sob condições estressantes de criação, as respostas imunes inatas ou não-específicas têm se

apresentado como ferramentas valiosas, já que são efetivas contra uma ampla variedade de antígenos (ROTLLANT et al., 1997). Dentre essas ferramentas, temos as alterações no número e no tipo de células de defesa circulantes. No presente estudo, foi avaliada a proporção de leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) e granulares (neutrófilos, eosinófilos e célula granulocítica especial) no sangue periférico. Os linfócitos são células relacionadas à resposta imune adaptativa, enquanto que a série granulocítica apresenta funções que estão diretamente relacionadas a imunidade inata e defesa inespecífica dos seres vivos. O único grupo que não apresentou alteração no número de leucócitos foi o C72h-100mg. Os demais apresentaram redução no número de células mononucleares e aumento de leucócitos granulares após a aplicação do estressor (somente manuseio ou manuseio e variação de temperatura), o que indica uma melhora da resposta imune inata. Nos grupos C0h e E24h houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes dietas (0, 100 e 300 mg de vitamina E/kg), sendo que a menor porcentagem de leucócitos mononucleares e, conseqüentemente, maior porcentagem de células granulares foram encontradas nos animais alimentados com 100 mg de vitamina E. Tal fato sugere que esta quantidade de vitamina E parece ter um efeito imunoestimulante melhor nesta espécie, sob as condições estudadas.

Le Morvan e colaboradores (1998) estudando os efeitos da mudança de temperatura sobre as defesas específicas e não-específicas dos peixes, concluíram que as defesas não-específicas (inatas) tendem a compensar a supressão das defesas específicas em baixas temperaturas até que o sistema imune específico se adapte.

Os resultados obtidos no presente estudo concordam com os achados de outros trabalhos. Falcon e colaboradores (2008) estudando os efeitos da baixa temperatura em tilápias-do-Nilo arraçadas com dietas suplementadas com vitamina C e lipídios observaram que o estímulo pelo frio determinou leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monocitose e concluíram que o estresse pelo frio diminui a resistência dos peixes a doenças, embora a suplementação melhore o sistema imunológico. Junior e colaboradores (2010) observaram que a temperatura de 17°C também causa linfopenia e neutrofilia em tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina. Signor e colaboradores (2010) também descreveram que o estresse pelo frio determina leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monopenia em tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com levedura e zinco. Dessa

forma, pode-se concluir que o prejuízo ocasionado pelo estresse térmico às condições de higiene dos peixes é evidente mesmo em condições nutricionais adequadas.

Garcia e colaboradores (2007) estudando pacus alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e E e desafiados por *Aeromonas hydrophila*, observaram que após o desafio, os peixes que haviam recebido a dieta suplementada com 0 mg de vitamina C e 250 mg de vitamina E apresentaram redução no número de monócitos.

As alterações nas proporções dos diferentes tipos de leucócitos são uma consequência das mudanças na distribuição de leucócitos. Células-alvo que possuem receptores para o cortisol têm sido detectadas em muitos tecidos dos peixes teleósteos, inclusive nas células sanguíneas, como os leucócitos. Os principais efeitos descritos do cortisol sobre o leucograma é a linfopenia e a neutrofilia (WOJTASZEK et al., 2002), fato que explica as alterações observadas na contagem diferencial de leucócitos no presente estudo.

Outra ferramenta extensamente utilizada para avaliação da resposta imune inata é a concentração ou atividade de lisozima sérica. A lisozima possui atividade lítica contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, realiza opsonização e ativa o sistema complemento e os fagócitos. Em peixes está presente no muco, no tecido linfóide, no plasma e em outros fluidos corporais (SAURABH; SAHOO, 2008).

A atividade lisozímica varia dependendo do sexo, idade, tamanho, estação do ano, temperatura da água, pH, presença de tóxicos, presença de patógenos e estressores (YILDIZ, 2006). De modo geral, uma correlação positiva entre a atividade de lisozima plasmática e a temperatura da água tem sido relatada em várias espécies de peixes.

No presente trabalho observou-se redução da concentração de lisozima sérica nos grupos E24h-0mg e E24h-100mg, sendo que após 72h houve aumento nos animais alimentados com 100 mg de vitamina E (E72h-100mg). Também ocorreu aumento no grupo C72h-300mg. Nos grupos C24h, C72h e E72h houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes dietas (0, 100 e 300 mg de vitamina E/kg), sendo que os maiores valores foram encontrados nos animais alimentados com ambas as dietas suplementadas com vitamina E. Estes resultados sugerem que a vitamina E é importante para promover a resposta imune inata nesta

espécie, por meio do aumento da quantidade de lisozima sérica. Tort e colaboradores (2004) também relataram redução nos níveis de lisozima em *Sparus aurata* em temperaturas mais baixas.

Tem-se descrito que vários imunostimulantes podem aumentar os níveis de lisozima sérica em peixes tanto pelo aumento do número de células que secretam lisozima quanto pelo aumento da quantidade de lisozima secretada por cada célula (KUMARI; SAHOO, 2006).

Este aumento no nível de enzima pode refletir mudanças na população de células brancas durante o desenvolvimento da resposta imune (SAURABH; SAHOO, 2008).

Pode-se ainda utilizar a atividade das proteínas do sistema complemento como ferramenta para avaliar o estado imunológico dos peixes. O sistema complemento é o maior componente do sistema imune inato envolvido na defesa contra todos os patógenos, por meio de proteínas que participam da opsonização, quimiotaxia e ativação de leucócitos e por meio da citólise realizada pelo complexo de ataque à membrana (RUS et al., 2005). Sabe-se que o sistema complemento também participa da imunidade adaptativa por modular e modificar as respostas pelas células T. A ativação do sistema complemento também participa da retirada de células apoptóticas e de complexos imunes da circulação por diferentes mecanismos (RUS et al., 2005).

Este sistema pode ser ativado pelas vias clássica, alternativa e das lectinas, sendo que todas convergem no ponto da clivagem de C3 e, então, geram o complexo de ataque à membrana C5b-9, levando à lise celular (RUS et al., 2005). No presente estudo realizou-se a determinação da atividade hemolítica do sistema complemento ativado pela via alternativa. Observou-se redução da atividade hemolítica do sistema complemento nos pacus alimentados com dieta não suplementada, 24 e 72h após a aplicação dos estressores (manuseio – grupos C24h-0mg e C72h-0mg; manuseio e variação de temperatura – grupos E24h-0mg e E72h-0mg). Também ocorreu tal redução nos peixes dos grupos E24h-100mg e C72h-300mg. Nos grupos C0h, C24h, C72h e E72h houve diferença entre os grupos alimentados com as diferentes dietas (0, 100 e 300 mg de vitamina E/kg), sendo que os maiores valores foram encontrados nos animais alimentados com 100 mg de vitamina E. Isto novamente sugere que esta concentração de vitamina E parece ter os efeitos mais benéficos para a espécie em questão e sob as condições estudadas.

É importante ressaltar que em todos os grupos os valores apresentados pelos animais alimentados com dieta suplementada com 300 mg de vitamina E foram menores, embora nem sempre estatisticamente significativo, que os valores apresentados pelos animais alimentados com dieta não suplementada, sugerindo que o excesso de vitamina E pode ser tão prejudicial quanto sua baixa dosagem. Tal conclusão também foi proposta por Garcia e colaboradores (2007).

Tort e colaboradores (1996a) estudando os efeitos do adensamento em *Sparus aurata* observaram aumento do cortisol plasmático e da glicemia, bem como diminuição da via alternativa do sistema complemento e dos linfócitos circulantes. O mesmo resultado foi obtido mesmo quando os animais foram alimentados com dietas suplementadas com vitamina E e ácidos graxos altamente insaturados (TORT et al., 1996b). Nesta mesma espécie submetida ao mesmo tipo de estressor, Ortuño e colaboradores (2001) observaram, além da depressão da atividade do sistema complemento, diminuição da atividade fagocítica. Rotllant e colaboradores (1997), estudando as respostas imunes após o estresse por adensamento em *Pagrus pagrus* também observaram aumento do cortisol plasmático e da glicemia e diminuição da via alternativa do sistema complemento e dos linfócitos circulantes. Tilápias (*Oreochromis mossabicus*) aclimatadas à 27°C e posteriormente submetidas à 19°C e 23°C também apresentaram atividade reduzida da via alternativa do sistema complemento, bem como redução dos níveis de lisozima (BOWDEN, 2008).

As práticas de aquicultura apresentam muitas situações nas quais o estresse e a injúria física podem aumentar consideravelmente a susceptibilidade aos patógenos presentes no ambiente (ASHLEY et al., 2007). Tort e colaboradores (2004) demonstraram que uma dieta adequada providenciando uma dose suplementar de vitaminas e minerais traço pode aumentar a proteção contra patógenos e reduzir alguns efeitos dos agentes estressores.

Montero e colaboradores (1999) relataram que a suplementação com vitamina E atuou na resposta ao estresse em *S. aurata* prevenindo a imunossupressão causada pelo mesmo. Esses autores ressaltaram ainda que a vitamina E parece ter um efeito mais protetor que a vitamina C nas condições experimentais estudadas (adensamento). Efeitos positivos da ingestão de vitamina E sobre o sistema imune inato também foram observados por outros autores (ORTUÑO et al., 2000; ORTUÑO et al., 2001).

Os dados obtidos até o presente momento permitem inferir que o pacu é suscetível às mudanças cíclicas e diárias de temperatura e apresenta um conjunto de respostas metabólicas e de imunidade inata que conferem ao seu organismo a capacidade de se adaptar às novas condições ambientais.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

1) A variação de temperatura foi geradora de estresse significativo, afirmação essa corroborada pela alteração de alguns parâmetros clássicos de estresse em peixes, como as concentrações plasmáticas de cortisol, glicose, lactato, amônia e íons.

2) Baseado nos dados de leucócitos mononucleares e granulares, lisozima sérica e atividade hemolítica, os grupos alimentados com dieta não suplementada e com dieta suplementada com 300 mg tiveram o mesmo comportamento, indicando que tanto a baixa dosagem quando a superdose de vitamina E pode ter efeitos indesejáveis nos processos fisiológicos de pacu.

3) Considerando-se os efeitos sobre a resposta imune inata e a redução de alguns efeitos do estresse podemos indicar a suplementação da ração com 100 mg de vitamina E como a melhor para o pacu nas condições estudadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.S. et al. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). **Braz. J. Biol.**, v. 69, p. 1133-1139, 2009.

ABREU, J.S. et al. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. **Braz. J. Biol.**, v. 69, n. 2, p. 415-421, 2009.

ALVAREZ-PELLITERO, P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 171-198, 2008.

AMLASHI, A.S. et al. Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga *Huso huso* L. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 807-814, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. ANA. **Avaliação das águas do Brasil**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2002.

ANDERSEN, D.E. et al. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 48, p. 1811-1817, 1991.

ANDRADE, J.I.A. et al. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 576–580, 2007.

APHA. **Standard methods for examination of water and wastes**. 12.ed. Washington DC: Join editorial board, 1980.

ASHLEY, P.J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 104, p. 199-235, 2007.

BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G.; WOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.26, p. 99-111, 2000.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Diseases**, Vancouver, v. 10, p. 3-26, 1991.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ. and Comp. Biol.**, v. 42, p. 517–525, 2002.

BENFEY, T.J.; BIRON, M. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Aquaculture**, v. 184, p. 167-176, 2000.

BIDINOTTO, P.M.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. **Boletim Técnico do Cepta**, v. 10, p. 53-60, 1997.

BILLER, J.D. **Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β -glucano**. 2008. 103 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

BOWDEN, T.J. Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 373-383, 2008.

BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 457-472, 2005.

CHAGAS, E.C. et al. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 132-225.

CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 86, p. 205-223, 2004.

COPLEY, N.G. Alloxan and ninhydrin test. **Analyst**, v. 66, p. 492-493, 1941.

DEMERS, N.E.; BAYNE, C.J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 21, n. 4, p. 363-373, 1997.

DHABHAR, F. S. Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, p. 300–317, 2009.

DONALDSON, M.R. et al. Cold shock and fish. **Journal of Fish Biology**, v. 73, p. 1491-1530, 2008.

DRABKIN, D. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci**, v. 215C, p. 110-111, 1948.

DUBOIS, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-358, 1956.

ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S. et al. (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications, p. 101-103, 1990.

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

ESTEVEZ, F. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência-Finep, 1988, 575p.

FACCIOLI, L.H. et al. IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a Visceral Larva Migrans Syndrome. **Mediators Inflammation**, v. 5, p. 24, 1996.

FALCON, D.R. et al. Leucograma da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 543-551, 2008.

FAO. **Fishstat Plus database: aquaculture production: quantities 1984-2004**. Rome. 2005. Version 2.31.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Rome, 2010. 197 p.

FERRIANI, V.P.; BARBOSA, J.E.; DE CARVALHO, I.F. Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titres in healthy children. **Acta Paediatr.**, v. 88, n. 10, p. 1062-1066, 1990.

FRASCA-SCORVO, C.M.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. Efeito do manejo alimentar no desempenho do matrinxã *Brycon amazonicus* em tanques de cultivo. **Acta amazonica**, v. 37, p. 621-628, 2007.

GALINDO-VILLEGA, J.; HOSOKAWA, H. Immunostimulants: Towards temporary prevention of disease in marine fish. In: MEMORIAS DEL VII SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México, 2004. **Anais Avances en Nutrición Acuicola VII**. México, 2004. p. 279-319.

GARCIA, F. et al. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, p. 39-46, 2007.

GATLIN III, D.M. et al. Potential application of prebiotics in aquaculture. In: VIII SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 2006, México. **Anais Avances en Nutrición Acuicola VIII**. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2006. p.371-376.

GENTZKOW, C.J.; MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Chem.**, v. 143, p. 531-544, 1942.

GONÇALVES, A.F.N. et al. Transporte de juvenis de curimatá *Prochilodus lineatus* em diferentes densidades. **Acta Sci. Anim. Sci. Maringá**, v. 32, n. 2, p. 205-211, 2010.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: sub ordem Characoidei**. Bacia do Rio Mogi Guaçu. Piracicaba: Franciscana, v. 2 , p. 217-397, 1975.

HALVER, J. E. The vitamins. In: HALVER, J.E., HARDY, R.W. **Fish Nutrition**. 3.ed. California: Academic Press, 2002. p. 61-141.

HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of dietary vitamin C on the immune responses of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 95, p. 201-214, 1991.

HARRIS, J.; BIRD, D.J. Modulation of the immune system by hormones. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 77, p. 163-176, 2000.

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lact acid. A micromethod adaptes to field colletion of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, n. 5, p. 224-228, 1972.

HOCHACHKA, P.W. **Living without oxigen: closed and open systems in hypoxia tolerance**. Cambridge: Harvard University press, 1980. 181 p.

HUANG, C.H. et al. Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 199–204, 2004.

HUNTINGFORD, F.A. et al. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, v. 68, p. 332-372, 2006.

IIDA, T.; KUROGI, J. Stress impairs non-specific defense activity of fish. **Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., Suppl.**, v. 5, p. 61-64, 2001.

INOUE, L.A.K.A.; SANTOS-NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon amazonicus* (Gunther, 1869). **Cienc. Rural**, v. 33, p. 943– 947, 2003.

INOUE, L.A.K.A. **Respostas do matrinxã (*Brycon cephalus*) a anestésicos e estressores**. 2005. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005. **OK**

IWAMA, G. et al. **Fish Stress and Health in Aquaculture**. Cambridge : University Press, 1997. 432 p.

IWAMA, G. et al. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15-19, 2004.

JOMORI, R. et al. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, p. 277-287, 2003.

JUNIOR, A.V.F. et al. Resposta hemática de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. **R. Bras. Zootec.**, v. 39, n. 8, p. 1619-1625, 2010.

KRIEGER-AZZOLINI, M. H. et al. A time-course study of physiological indicators of handling stress in tropical fish *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.22, p. 1019-1022, 1989.

KRUGER, N. The Bradford method for protein quantification. **Methods in molecular biology**, v. 32, p. 9-15, 1994.

KUMARI J.; SAHOO P.K. Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 95-101, 2006.

LE MORVAN, C.; TROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 165–168, 1998.

LEHNINGER, A. L. **Biochemistry**. 2nd Edition. New York: Worth Publ., 1977. 1104 p.

LI, Y.; LOVELL, R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. **J. Nutr.**, v. 115, p. 123–131, 1985.

LIMA, A.O. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1969. p. 653.

LU, G. D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B deficient state. I.A. rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.**, v. 33, p. 249-254, 1939.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137-151, 2006.

MAYER-GOSTAN, N.; WENDERLAAR BONGA, S. E.; BALM, P. H. M. Mechanisms of hormone actions on gill transport. In: PANG, P.K.T.; SCHEREIBMAN, M.P. **Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Medical Implications**. Orlando: Academic press, 1987. p. 211-213.

MAULE, A.G. et al. Stress alters the immune function and disease resistance in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. **J. Endocrinol.**, v. 120, p. 135-142, 1989.

MAULE, A.G.; SCHRECK, C.B. Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. **J. Aquat. Anim. Health**, v. 2, p. 298-304, 1990.

MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p. 201-212, 1977.

MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A.D. (Ed.). **Stress and fish**. New York: Academic Press, 1981. p. 49-75.

MCCORMICK, S.D. Hormonal control of gill Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell function. In: WOOD, C.M., SHUTTLEWORTH, T.J. (Ed.). **Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation** (Fish Physiology, XIV). San Diego: Academic Press, 1995. p. 285-315.

MCCORMICK, S.D.; MORIYAMA, S.; THRANDUR BJORNSSON, B. Low temperature limits photoperiod control of smelting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms. **American Journal of Physiological Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, p. 1352–1361, 2000.

MCDONALD, D.G., MILLIGAN, C.L. Chemical properties of the blood. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., FARRELL, A.P. (Ed.). **Fish Physiology**, v. XIIB. New York: Academic Press, 1992. p. 55-133.

MCDONALD, D.G., MILLIGAN, C.L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (Ed.). **Fish Stress and Health in Aquaculture**. Cambridge: University Press, 1997. 432p.

MOMMSEN, T.P., DANULAT, E.; WALSH, P.J. Metabolic actions of glucagons and dexamethasone in liver of the ureogenic teleost *Opsanus beta*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.85, p. 316-326, 1992.

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

MONTERO, D. et al. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, v. 171, p. 269–278, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish**. Washington: Academic Press, 1993. 114 p.

NIKOSKELAINEN, S.; BYLUND, G.; LILIUS, E.M. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 581–592, 2004.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. High dietary intake of α -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, p. 293–307, 2000.

ORTUÑO, J. et al. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 79, p. 167–180, 2001.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata*). **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 84, p. 17-27, 2002.

PERRY, S.F.; BERNIER, N.J. The acute humoral adrenergic stress response in fish: facts and fiction. **Aquaculture**, v. 177, p. 285-295, 1999.

PICKERING, A.D. Introduction: the Concept of Biological Stress. In: Pickering A. D. (Ed.). **Stress and fish**. New York: Academic Press, 1981. p. 1-10.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Stress response and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 7, p. 253-258, 1989.

PORTZ, D.E., WOODLEY, C.M., CECH JR., J. J. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. **Review in Fish Biology and Fisheries**, v. 16, p. 125-170, 2006.

PRESS, C.M.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 309-318, 1999.

PULSFORD, A.L. et al. Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, p. 631-643, 1995.

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

ROTLLANT, J. et al. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. **Aquaculture**, v. 156, p. 279-290, 1997.

RUS, H.; CUDRICI, C.; NICULESCU, F. The role of the complement system in innate immunity. **Immunologic Research**, v. 33, n. 2, p. 103-112, 2005.

SADO, R.Y. **Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2008. 136 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SAKAI, D.K. The assessment of the health condition of salmonids by non-specific haemolytic (SH50) activity of serum. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 49, p. 1487-1491, 1983.

SAKAI, D.K. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms in fish. **Ann. Rev. Fish Diseases**, v. 2, p. 223-248, 1992.

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

SAS. Statistical Analyses System. **User' s guide**. Version 8.0. North Caroline: SAS INSTITUTE, 2001.

SAU, S.K. et al. Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (*Labeo rohita*) fry. **Aquaculture**, v. 240, p. 359–368, 2004.

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

SCHRECK, C.B.. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: Moberg, G.P., Mench, J.A. (Ed.). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. **CABI Publishing, CAB International**, Oxon and New York, p. 147–158, 2000.

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

SIGNOR, A. et al. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-nylo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. **Ci. Anim. Bras., Goiânia**, v. 11, n. 3, p. 509-519, 2010.

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

TAKAHASHI, L.S.; ABREU, J.S.; BILLER, J.D.; URBINATI, E.C. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. **Acta Sci. Anim. Sci. Maringá**, v. 28, n. 4, p. 469-475, 2006.

TANCK, M.; BOOMS, G.; EDING, E.; WENDERLAAR BONGA, S.; KOMEN, J. Cold shocks: a stressor for common carp. **Journal of Fish Biology**, v. 57, p. 881-894, 2000.

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

TORT, L. et al. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 51, p. 179-188, 1996a.

TORT, L. et al. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. **Aquaculture International**, v. 4, p. 31-41, 1996b.

TORT, L. et al. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. **Aquaculture**, v. 229, p. 55–65, 2004.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with the alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 6, p. 24-25, 1969.

TRIPP, R.A. et al. Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocyte response in vitro. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 11, p. 565-576, 1987.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 225-256.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p. 21-36, 1994.

VERLHAC, V. et al. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 409-424, 1998.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. DSM Nutritional Products, 2000. Disponível em: <www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/51644_VitaminC.pdf>. Acesso em: 16 de março de 2009.

VIJAYAN, M.M., FOSTER, G.D., MOON, T.W. Effects of cortisol on hepatic carbohydrate metabolism and responsiveness to hormones in the sea raven *Hemirhamphus intermedius*. **Fish Physiol. Biochem.**, v.12, p. 327-335, 1993.

VIJAYAN, M.M., PEREIRA, C., MOON, T.W. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.108C, p. 321-329, 1994.

VIJAYAN, M.M. et al. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.96, p. 75-84, 1994.

VIJAYAN, M.M. et al. Metabolic effects of cortisol in a marine teleost, the sea raven. **J. Exp. Biol.**, v.199, p. 1509-1514, 1996.

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

WATTS, M.; MUNDAY, B.L.; BURKE, C.M. Investigation of humoral immune factors from selected groups of southern bluefin tuna, *Tunnus maccoyii* (Castelnau): implications for aquaculture. **Journal of Fish Disease**, v. 25, p. 191-200, 2002.

WEDEMEYER, G. A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. Chapman & Hall., v.2, 1996. p.10-59.

WEDEMEYER, G.A.. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (Ed.). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. **Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 62**. Cambridge: University Press, p. 35–71, 1997.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiol. Rev.**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WEYTS, F.A.A. et al. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-Interrenal axis in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 1–20, 1999.

WOJTASZEK, J. et al. Hematological Effects of High Dose of Cortisol on the Carp (*Cyprinus carpio* L.): Cortisol Effect on the Carp Blood. **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, p. 176–183, 2002.

YILDIZ, H.Y. Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after exposure to Leteux-Meyer mixture. **Turkey Journal of Animal Science**, v. 30, p. 265-269, 2006.