

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - PPGCF

**Efeito da dieta suplementada com vitamina E e Cobre nas respostas
metabólicas e antioxidantes de matrinxã, *Brycon cephalus*
(GÜNTHER, 1869), frente a hipóxia.**

Laila Romagueira Bichara dos Santos

São Carlos – SP

2006

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - PPGCF

**Efeito da dieta suplementada com vitamina E e Cobre nas respostas
metabólicas e antioxidantes de matrinxã, *Brycon cephalus*
(GÜNTHER, 1869), frente a hipóxia.**

Laila Romagueira Bichara dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração Ciências Fisiológicas.

São Carlos – SP

2006

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

S237ed

Santos, Laila Romagueira Bichara dos.

Efeito da dieta suplementada com vitamina E e cobre nas respostas metabólicas e antioxidantes de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869), frente à hipóxia / Laila Romagueira Bichara dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

95 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Peixe - fisiologia. 2. Antioxidante. 3. Metabolismo. 4. Hipóxia. I. Título.

CDD: 597.01 (20^a)

ORIENTADORA

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pela orientação, apoio e confiança depositada.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À Piscicultura Águas Claras, Mococa –SP, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

Ao prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin que permitiu a utilização de diversos equipamentos de seu laboratório.

À banca examinadora profas. Dras. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Cleoni dos Santos Carvalho e Marisa Narciso Fernandes pelas sugestões.

Ao amigo Luis Inoue pelo empréstimo do oxímetro, sem o qual os experimentos não poderiam ser realizados.

Ao Nelson A. Matos *in memoriam* pelo auxílio na manutenção dos animais no laboratório e ao José Roberto Sanches.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas. Em especial às profas. Dras. Ana Lúcia Kalinin e Keico Okino Nonaka pela ajuda e momentos agradáveis que proporcionaram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF).

Aos amigos do laboratório e departamento Fábio, Guilherme, Aurélia, Cheila, Mônica, Wagner, Jeane, Diana, Cláudia, Lenise, Lyandra, André, Flávia, Cleoni, Cleo, Marise, Juciléia, Fernando, Daniel, Thiago Barreto, Thiago, Kátia, Helen, Alessandra, Vanessa pela ajuda dispensada e momentos agradáveis que me proporcionaram durante todo o período em que estive no laboratório.

À amiga Heloisa que me acompanhou na graduação e, que mesmo de longe, torceu por mim durante esse trabalho.

Ao amigo Charles que me acompanhou desde o início da graduação.

Às amigas Lidi, Valéria e Lucélia pelas risadas nas FeSBes.

Às amigas Eliane e Fernanda pelo companheirismo e auxílio durante o período experimental, durante as análises e principalmente após as análises. Em especial à amiga Eliane por ter me “abrigado” em sua casa e a partir disso ter surgido uma bela amizade.

Em especial aos meus pais e meu irmão pelo exemplo de vida, amor, apoio e incentivo para que não desistisse de meus sonhos, por mais impossíveis que me parecessem.

E finalmente, a Deus pelo seu amor e coragem que me dá a cada dia.

Sumário

	Pág
<u>1. Introdução</u>	1
1.1. Antioxidantes e Pró-oxidantes	2
1.2. Defesas antioxidantes não-enzimáticas	6
1.2.1. Vitamina E (α-tocoferol)	6
1.2.2. Cobre	8
1.3. Hipóxia	10
1.4. Metabolismo Intermediário	13
<u>2. Objetivos</u>	16
<u>3. Materiais e Métodos</u>	17
3.1. Material biológico	17
3.2. Protocolo Experimental	18
3.3. Dieta	19
3.4. Análises sanguíneas	20
3.5. Determinação dos Intermediários Metabólicos	21
3.5.1. Concentração de glicose	21
3.5.2. Concentração de lactato	21
3.5.3. Concentração de piruvato	22
3.5.4. Concentração de amônia	22
3.6. Determinação da concentração de glicogênio	23
3.7. Determinação da concentração de proteína	23
3.8. Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo	24
3.8.1. Concentração de hidroperóxidos (HP)	24
3.8.2. Atividade da superóxido dismutase (SOD)	24

3.8.3. Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)	25
3.8.4. Atividade da catalase (CAT)	25
3.9. Análise Estatística	26
<u>4. Resultados</u>	27
4.1. Efeitos nos parâmetros hematológicos	27
4.2. Efeitos Metabólicos	30
4.2.1. Glicose, lactato, piruvato e amônia no plasma	30
4.2.2. Glicose, lactato, piruvato e amônia no fígado	30
4.2.3. Glicose, lactato, piruvato e amônia no músculo vermelho	31
4.2.4. Glicose, lactato, piruvato e amônia no músculo branco	31
4.2.5. Glicogênio no fígado e músculos branco e vermelho	32
4.2.6. Proteína no plasma, fígado e músculos branco e vermelho	32
4.3. Efeitos nos parâmetros de estresse oxidativo	39
4.3.1. Concentração de HP e atividade de SOD e GSH-Px no plasma	39
4.3.2. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT no fígado	39
4.3.3. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT nas brânquias	39
4.3.4. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT no coração	40
4.3.5. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT no músculo vermelho	41
4.3.6. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT no músculo branco	41

<u>5. Discussão</u>	48
5.1. Efeitos nos parâmetros hematológicos	48
5.2. Efeitos Metabólicos	52
5.3. Efeitos nos parâmetros de estresse oxidativo	58
<u>6. Conclusões</u>	67
<u>7. Referências</u>	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema de geração de ERO e DA enzimáticas (modificado de RAMOS *et al.*, 2000 e DRÖGE, 2002). 5
- Figura 2.** Exemplar de matrinxã, *Brycon cephalus*. 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração (mg/kg de ração) de cobre, vitamina E, bromo, ferro, manganês e zinco constituintes da ração controle (Co) e das rações suplementadas com vitamina E (E) e vitamina e cobre (E+Cu). 20

Tabela 2. Valores hematológicos médios (\pm EPM) de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Sempre que houver interação entre os fatores dieta e OD: Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo. 29

Tabela 3. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no plasma de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo. 33

Tabela 4. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no fígado de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo. 34

Tabela 5. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no músculo vermelho de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo. 35

Tabela 6. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no músculo branco de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo. 36

Tabela 7. Concentrações de glicogênio no fígado e músculos branco e vermelho de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p<0,05$). (ns) não significativo. 37

Tabela 8. Concentrações de proteína no fígado e músculos branco e vermelho de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p<0,05$). (ns) não significativo. 38

Tabela 9. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) e concentração de hidroperóxidos (HP) no plasma de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p<0,05$). (ns) não significativo. 42

Tabela 10. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) no fígado de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p<0,05$). (ns) não significativo. 43

Tabela 11. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) nas brânquias de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p<0,05$). (ns) não significativo. 44

Tabela 12. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) no coração de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo. 45

Tabela 13. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) no músculo vermelho de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo. 46

Tabela 14. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) no músculo branco de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo. 47

RESUMO

A dieta é fator essencial para o crescimento e manutenção das funções vitais principalmente frente a situações adversas. Em pisciculturas ocorrem situações de redução na concentração de oxigênio na água que podem reduzir o crescimento dos animais uma vez que interferem no metabolismo. A suplementação da dieta com vitaminas e metais essenciais, dentre eles o cobre e vitamina E, que tem função antioxidante, podem melhorar as defesas dos animais frente a estressores. Exemplares de matrinxã, *Brycon cephalus*, espécie promissora para piscicultura, foram alimentados durante 30 dias com ração comercial (Co) e ração suplementada com vitamina E (E) e vitamina E+cobre (E+Cu) e, posteriormente, foram expostos a hipóxia (Hpx) durante 24h (OD = 2,87 mgO₂/L). As alterações hematológicas [hematócrito (Hct), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC) volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina média (HCM) e concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM)]; alterações metabólicas [concentrações de glicose, lactato, piruvato, amônia, glicogênio e proteína no plasma (exceção do glicogênio), fígado, músculos vermelho e branco] e os parâmetros de estresse oxidativo [(concentração de hidroperóxidos de lipídios (HP), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GHS-Px) e catalase (CAT)] nos mesmos tecidos com exceção do plasma, além de brânquias e coração foram analisadas em normóxia e hipóxia. A dieta E e, principalmente, a E+Cu parecem ter aumentado a capacidade aeróbica de matrinxã quando em hipóxia, pois houve aumento na [Hb] e CHCM no grupo E+Cu e aumento no CHCM em E, além de aumento no piruvato e ausência de aumento no lactato na maioria dos tecidos dos animais tratados com dieta suplementada. A hipóxia gerou aumento na concentração de HP somente no plasma e a dieta suplementada alterou parâmetros de estresse oxidativo, assim como hematológicos e metabólicos. A vitamina E reduziu HP em coração e músculo vermelho quando em hipóxia e a vitamina E + cobre aumentou atividade enzimática sem gerar aumento na concentração de HP, mesmo em condições de maior metabolismo aeróbico. Os resultados obtidos sugerem que as dietas suplementadas aumentaram a capacidade aeróbica de matrinxã em hipóxia sem aumentar o estresse oxidativo nesses animais, enquanto os ajustes metabólicos frente à reduzida concentração de O₂ foram eficientes em manter o aporte de O₂ para os tecidos, já que a hipóxia só alterou os parâmetros analisados quando em associação com as dietas diferenciadas.

ABSTRACT

The diet is an essential factor for the growth and maintenance of vital functions as well as to ability fish to reply the stressors. The reduction of oxygen concentration in the water may occur mainly in fish culture ponds, and may reduce the growth rate of the animals due to metabolism changes. Therefore the supplementation of the diet with copper and vitamin E can improve the animals' defenses. Matrinxã specimens, *Brycon cephalus*, promising specie for fisheries, were fed with commercial ration (Co) and rations supplemented with vitamin E (E) and vitamin E+copper (E+Cu) during 30 days following by exposure to hypoxia (Hpx) during 24h (DO = 2,87 mgO₂/L). The hematological variables [hematocrit (Hct), hemoglobin concentration ([Hb]), red blood cells (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean hemoglobin concentration (MHC) and mean corpuscular hemoglobin concentratrion (MCHC)]; metabolic changes such as concentrations of glucose, lactate, piruvate, ammonia, glycogen and protein in liver, red and white muscles and plasma (exception of glycogen) and, the oxidative stress parameters as concentration of peroxide lipids (HP), activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GHS-Px) and catalase (CAT) (exception in plasma) in the same tissues, including the gills and heart. The diets E and E+Cu may increase the aerobic capability of matrinxã when in hypoxic condition as there were increases of [Hb] and MCHC in group E+Cu and an increase in MCHC in E accompanied by an increase in the pyruvate and no change in lactate in most of tissues of fish fed wit supplemented diets. These results support the view that the both supplemented diets, and mainly the E+Cu, seem to increased the aerobic capacity of matrinxã during hypoxia. Hypoxia increased HP concentration only in the plasma and the supplemented diet change the oxidative stress, hematological and metabolical parameters. The diet E reduced HP concentration in the heart and red muscles during hypoxia and the diet E+Cu increased the enzyme concentration and activity without generated HP increase, even in conditions of higher aerobic metabolism. The obtained results suggest that the supplemented diets increased the aerobic capacity of matrinxã during hypoxia without increasing oxidative stress, while the metabolic adjustments front to the reduced concentration of O₂ had been efficient to maintain the O₂ delivery to the tissues since the hypoxia only modified the parameters analyzed when in association with the differentiated diets.

1. Introdução

A performance de qualquer atividade a ser realizada requer gasto de energia e a reposição dessa energia é realizada via ingestão de alimentos. Proteínas, carboidratos e lipídios podem ser utilizados como fontes de energia sendo as proteínas essenciais para o crescimento (BORBA *et al.*, 2003). Por isso, a dieta é fator essencial para o crescimento e manutenção de funções vitais como a resposta a estressores e defesas imunológicas de peixes. O funcionamento eficiente do organismo também depende da presença de certos lipídios e uma variedade de outros nutrientes (vitaminas e minerais) (JOBBLING, 1994), que podem ter seu requerimento alterado quando há suplementação da dieta com mais de um fator, pois a absorção destes pode ser aumentada ou diminuída alteradas suas concentrações em relação a concentração de outros fatores.

A dieta fornecida aos animais pode alterar inclusive a qualidade dos filés de peixe, como, por exemplo, a ausência de vitamina E na dieta, que gera danos à estrutura muscular e é muito importante no processo de produção do pescado. Por isso há a necessidade de se determinar os níveis ótimos de cada nutriente para as diferentes espécies.

Os parâmetros utilizados para a determinação do requerimento ideal de nutrientes variam entre os diferentes estudos devido a grande dificuldade na determinação da quantidade ideal de nutrientes para peixes, pois a diversidade de espécies é muito grande. Muitos trabalhos determinam níveis tóxicos ou ideais utilizando parâmetros zootécnicos como crescimento e conversão alimentar, enquanto outros utilizam o estado de peroxidação das membranas celulares, principalmente no caso de vitaminas antioxidantes, como a vitamina E e C e micronutrientes como cobre, zinco e selênio (WATANABE & SATOH, 1997; BERNTSSEN *et al.*, 1999a, 1999b; KIM & KANG, 2004). Em *Oncorhynchus mykiss*, por exemplo, a necessidade de

vitamina E foi determinada como 20mg/kg de alimento utilizando o crescimento como parâmetro (BELL & COWEY, 1985) e 50mg/kg de dieta utilizando os parâmetros oxidativos, como a peroxidação lipídica (COWEY *et al.*, 1983).

Em pisciculturas há diversas fontes de estresse aos animais, como aumento na concentração de matéria orgânica, o confinamento, a alta densidade de peixes, a concentração de oxigênio na água que podem diminuir o crescimento dos animais por alterar o metabolismo do animal. Por isso há necessidade de determinar concentrações ótimas de cada componente alimentar para aumentar a resistência ao estresse e promover crescimento maior e mais rápido desses animais.

Portanto, a dieta fornecida não altera somente o crescimento dos animais, mas também o seu metabolismo, pois a quantidade de energia obtida pelo alimento depende da concentração e disponibilidade de cada nutriente na dieta. Dentre os nutrientes que são necessários para a manutenção das funções vitais e crescimento dos animais em piscicultura estão a vitamina E e o cobre. Esses dois componentes são antioxidantes que permitem maior estabilidade das membranas celulares e assim possivelmente permitem aos peixes utilizar as fontes energéticas (seja a fornecida pela dieta ou a acumulada em seus tecidos) para o crescimento e reprodução ao invés de utilizá-los para os reparos de contínuos danos às membranas causados pelo estresse oxidativo.

1.1. Antioxidantes e Pró-oxidantes

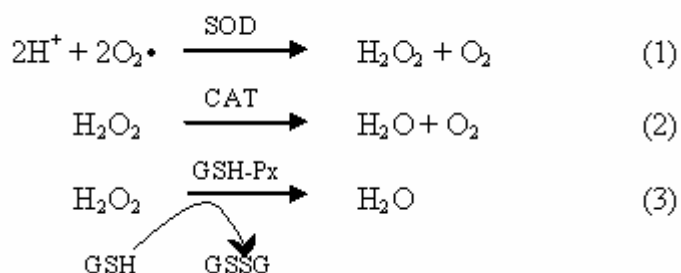
Quimicamente todo composto, incluindo o oxigênio, capaz de receber elétrons é um agente oxidante (BERRY & KOHEN 1999; PRIOR & CAO, 1999). Dentre as espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais de oxigênio amplamente denominadas como pró-oxidantes há espécies radicais, como o ânion superóxido ($O_2\bullet$) e os radicais hidroxila ($\bullet OH$) e espécies não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As

espécies radicais apresentam pelo menos um elétron desemparelhado que é capaz de seqüestrar um elétron ou átomo de hidrogênio de outra molécula e as espécies não radicais são capazes de gerar novos pró-oxidantes (DRÖGE, 2002; KOHEN & NYSKA 2002; ABELE & PUNTARULO, 2004). Essas ERO são continuamente produzidas pelo organismo em condições fisiológicas normais, sendo a respiração celular a principal fonte endógena destes radicais (NOHL & HEGNER, 1978; CHANCE *et al.*, 1979; SHIGENAGA *et al.*, 1994, HAN *et al.*, 2001). A mitocôndria é a maior fonte de ERO (RICHTER *et al.*, 1995), no entanto células de defesa como neutrófilos, eosinófilos e monócitos liberam ERO como o $O_2\bullet$ durante o processo de infecção a fim de eliminar os microrganismos invasores o que mostra que a produção de ERO não gera somente danos, mas é também essencial para determinados processos de defesa do organismo (GINSBURG, 1998; GINSBURG & KOHEN, 1995; KOHEN & NYSKA, 2002).

A saúde de animais está relacionada ao equilíbrio entre a produção de ERO e a ação dos agentes antioxidantes. A produção de ERO pode gerar danos ao DNA, membranas celulares e proteínas (KLATT & LAMAS, 2002) e os antioxidantes protegem as células contra a produção de radicais livres. Os hidroperóxidos formados durante o processo de oxidação podem inativar proteínas essenciais, enzimas e ácidos nucléicos, além de serem danosos às membranas celulares (CHOW, 1991). Em peixes, a peroxidação lipídica *in vivo* causada por radicais de oxigênio é a principal causa de doenças severas como catarata, anemia e fragilidade eritrocitária (SAKAI *et al.*, 1998; WAAGBØ *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2004).

O mecanismo de defesa antioxidante (DA), para conter a superprodução de ERO no organismo, consiste em moléculas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas que protegem os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFA) das reações de peroxidação que ocorrem, em maior grau, em peixes do que em mamíferos (BELL & COWEY, 1985;

STORELLI *et al.*, 1998; TOCHER *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004; RAU *et al.*, 2004). Dentre as moléculas antioxidantes enzimáticas a superóxido dismutase (SOD) catalisa a produção de H_2O_2 (reação 1), que é então removido por duas enzimas: a catalase (CAT), que reduz o H_2O_2 a água e oxigênio (reação 2) e as peroxidases como a glutathiona peroxidase (GSH-Px) que reduz o H_2O_2 a água, (reação 3).



O sistema de defesa antioxidante não-enzimático é constituído de fatores nutricionais como: vitamina E (α -tocoferol), vitamina C, β -caroteno (DANDAPAT *et al.*, 2000; KLATT & LAMAS, 2002), metais essenciais como o cobre, o zinco (componentes da superóxido dismutase, CuZn-SOD), o manganês e o selênio (componente da glutathiona peroxidase, GSH-Px) (CHOW, 1991; WISE *et al.*, 1993; SUKALSKI *et al.*, 1997; CHOW *et al.*, 1999; DANDAPAT *et al.*, 2000; LYGREN *et al.*, 2000; GAETKE & CHOW, 2003; NG *et al.*, 2004). A glutathiona reduzida (GSH) e a metalotioneína (MT) têm papel importante no processo de remoção dos ERO, a GSH atuando junto com a GSH-Px ou no processo de desintoxicação (Figura 1). Além das metalotioneínas, que juntamente com a GSH são importantes ao se ligarem a metais permitindo a liberação do cobre, por exemplo, às enzimas dependentes desse metal e impedindo a oxidação de estruturas celulares respectivamente (STILLMAN, 1995).

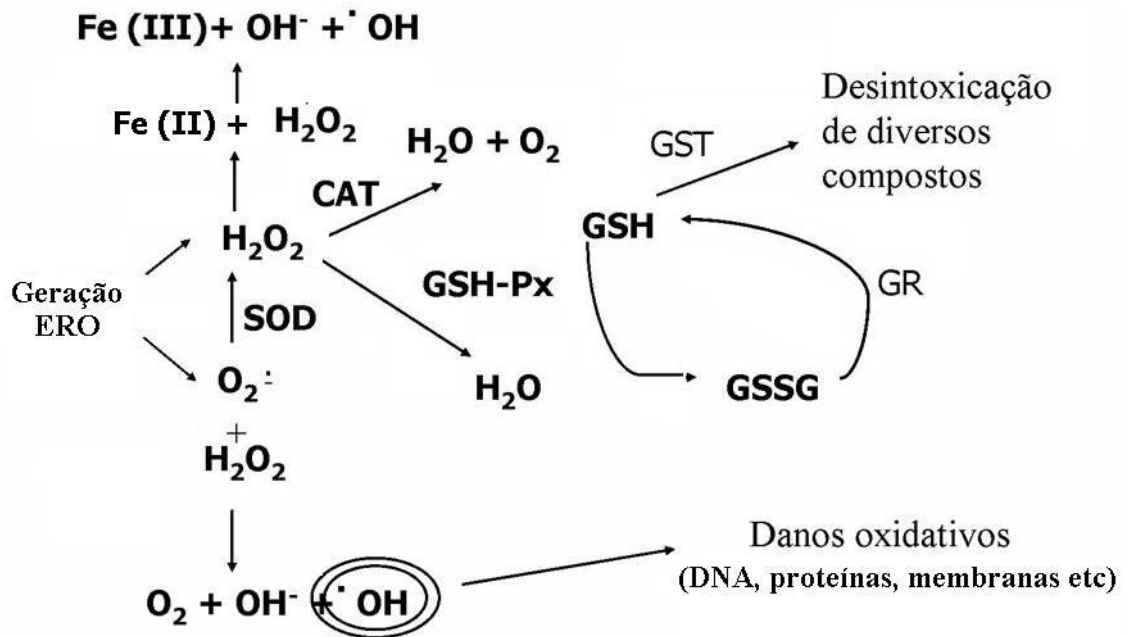


Figura 1: Esquema de geração de ERO e DA enzimáticas (modificado de RAMOS *et al.*, 2000 e DRÖGE, 2002).

Denomina-se estresse oxidativo a situação em que há um distúrbio entre os sistemas pro e antioxidantes, em favor dos primeiros (SIES, 1986). Esse estresse oxidativo pode ser gerado por um aumento na geração de ERO ou redução da atividade antioxidante, ou mesmo pelos dois processos simultaneamente (DAVIES, 2000; KLATT & LAMAS, 2000) e pode resultar em aumento da peroxidação lipídica (LPX), que gera hidroperóxidos de lipídios (HP) os quais têm sido amplamente utilizados como indicadores de estresse oxidativo (KAPUS & SIES, 1981).

Em geral, as DA têm sido estudadas em eritrócitos e fígado de peixes (FITZGERALD, 1992; WILHELM FILHO & MARCON, 1996; MARCON & WILHELM FILHO, 1999; WILHELM FILHO *et al.*, 2005), mas não em outros tecidos

ou órgãos como as brânquias, que são os principais órgãos para a absorção de oxigênio, e têm importante papel na manutenção do equilíbrio iônico, ácido-básico (ALBERS, 1970; RANDALL, 1970; BRAUNER & JENSEN, 1999; SUNDIN, 1999; FERNANDES *et al.*, 1999) e difusão de H₂O₂ (WILHELM FILHO *et al.*, 1999). Os músculos branco e vermelho também são importantes, pois o filé é fonte de alimento e sua qualidade pode ser alterada pela aumentada concentração de ERO e o músculo vermelho pode ser fonte de ERO devido à sua grande capacidade oxidativa (ASKNES & NJAA, 1981; WILHELM FILHO *et al.*, 1993).

1.2. Defesas antioxidantes não-enzimáticas

1.2.1. Vitamina E (α -tocoferol)

Como citado acima, a vitamina E ou α -tocoferol (α -T) faz parte das DA e tem função de proteção de membranas biológicas e lipoproteínas contra oxidação sendo por esta razão administrada na dieta de animais em cultivo que estão sujeitos a situações de estresse. DEVLIN (1997) ressaltou que, devido ao caráter lipofílico, a vitamina E acumula em membranas celulares e depósitos de gordura onde reage rapidamente com os ERO atuando como removedor desses compostos e protegendo os ácidos graxos insaturados de reações de peroxidação. As membranas de peixes são ricas em ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFA) o que pode resultar em maior requerimento de α -T (WATANABE *et al.*, 1981; COWEY *et al.*, 1983; STÉPHAN *et al.*, 1995). O nível e estado de oxidação dos PUFA na dieta, assim como a presença de outros antioxidantes como o selênio, podem alterar a necessidade de vitamina E na dieta dos peixes (LOVELL *et al.*, 1984; GATLIN & WILSON, 1986; BAI & LEE, 1998).

A redução na ingestão da vitamina E reduz o hematócrito e aumenta a fragilidade dos eritrócitos, os quais são sinais de perda da estabilidade das membranas

causada pela ação dos radicais livres sobre elas. A ausência de vitamina E pode gerar distrofia muscular, degeneração de gorduras do fígado, anemia, hemólise eritrocitária, hemorragias e despigmentação. Sendo assim, a adição de vitamina E às dietas pode contribuir para evitar danos oxidativos nas células sanguíneas e em músculos congelados, aumentando assim a estabilidade oxidativa dos filés de peixe (POSTON *et al.*, 1976; COWEY *et al.*, 1983; NRC, 1993; HE & LAWRENCE, 1993). A vitamina E também é importante na resposta imune, pois aumenta: a atividade de macrófagos e do sistema complemento e a produção de superóxido gerado por neutrófilos em atividade em *Sparus aurata* e bagre do canal (WISE *et al.*, 1993; MONTERO *et al.*, 2001).

O requerimento ideal de vitamina E, assim como de outros nutrientes é bastante variável. Estudos mostram que, para peixes e crustáceos, em geral de zonas temperadas, o requerimento ideal pode variar de 20 a 100 mg/kg de alimento (HARLIOGLU & BARIM, 2004). Em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, por exemplo, as concentrações ideais de vitamina E variam de 20 a 50mg/kg de ração dependendo de diversos fatores, como tamanho e idade dos animais e do parâmetro utilizado na análise (crescimento ou peroxidação de membranas) (COWEY *et al.*, 1983; BELL & COWEY, 1985). Concentrações elevadas de α -T no bagre africano, *Clarias gariepinus* (BAKER & DAVIES, 1996, 1997; NG *et al.*, 2004) e em outras espécies de peixes como em truta arco-íris (CHAIYAPECHARA *et al.*, 2003) aumentam a estabilidade dos filés de peixes, reduzindo sua oxidação e melhorando o sabor já que o produto demora mais para oxidar (GATLIN *et al.*, 1992; RUFF *et al.*, 2002).

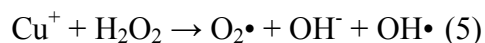
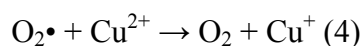
Alguns estudos mostraram que muitos peixes não alteram seu crescimento frente a diferentes concentrações de vitamina E na dieta, dessa forma ensaios de peroxidação são bastante eficientes para se determinar o requerimento e o “status” de vitamina E em

várias espécies de vertebrados (POSTON *et al.*, 1976; BAI & GATLIN, 1983; COWEY *et al.*, 1983; STÉPHAN *et al.*, 1993; MONTERO *et al.*, 2001).

1.2.2. Cobre

Suplemento alimentar com cobre já tem sido utilizado para tratamento de anemia em animais (HART *et al.*, 1928). O cobre é reconhecido como nutriente essencial para hematopoiese e funcionamento de algumas enzimas envolvidas em vários processos biológicos necessários para o crescimento e desenvolvimento. A dopamina hidroxilase, a citocromo oxidase (papel vital na respiração celular) que apresenta dois íons cobre em sua estrutura e a CuZn- que tem como componentes o cobre e o zinco SOD (LEHNINGER, 1975; BLOOMER & LEE, 1978; WESER *et al.*, 1979; MOORE & RAMAMOORTHY, 1984; BELL & COWEY, 1985; TORRES *et al.*, 1987; MCCORD, 2000; GAETKE & CHOW, 2003). A deficiência de cobre pode reduzir a atividade da ceruloplasmina, catalase e SOD (PAYNTER *et al.*, 1979; TAYLOR *et al.*, 1988; SUKALSKI *et al.*, 1997; PAN & LOO, 2000), que são componentes do sistema de defesa antioxidante e suas reduzidas atividades poderiam gerar estresse oxidativo.

No entanto, o cobre pode, quando em altas concentrações, ser reduzido de Cu^{2+} a Cu^+ via equação de Haber-Weiss (reações 4 e 5) (STOREY, 1996; GAETKE & CHOW, 2003), catalisar a formação de radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), o mais potente radical oxidante capaz de se ligar a praticamente todas as moléculas biológicas (BUETTNER, 1993). Além disso, o cobre também colabora para a formação de $\text{OH}\cdot$ a partir de hidro e lipoperóxidos aumentando a peroxidação das membranas (BAKER *et al.*, 1998) o que pode gerar alteração em parâmetros sanguíneos, como hematócrito e hemoglobina, gerando anemia e aumento do coração em ratos deficientes em cobre (GATLIN & WILSON, 1986; LAI *et al.*, 1996).

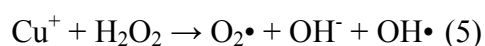


Estudos nutricionais a respeito do requerimento de cobre na dieta em espécies de peixes tropicais são escassos. Alguns trabalhos mostraram que o crescimento de peixes pode ser reduzido em concentrações superiores a 16-40 mg de Cu/kg de ração em bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, alimentado durante 16 e 13 semanas respectivamente; acima de 35mg de Cu/kg de ração para salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.); 125mg de Cu/kg de ração em *Sebastes schlegeli* e 730mg de Cu/kg de ração em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, (MURAI *et al.*, 1981; GATLIN & WILSON, 1986; WATANABE *et al.*, 1997; KIM & KANG, 2004). Estes estudos mostraram que a determinação do requerimento de cobre para uma determinada espécie pode variar em função de sua sensibilidade a este metal e o tempo de tratamento que pode alterar as respostas do animal, tais como crescimento e conversão alimentar. O requerimento de cobre também pode ser alterado em presença de outros fatores nutricionais como as vitaminas C e E e Zn e Se (GAETKE & CHOW, 2003).

A interação entre o cobre e a vitamina E fica evidente na redução da peroxidação lipídica gerada pelo acréscimo de vitamina E em hepatócitos e músculos de porcos com alta concentração de cobre (SOKOL *et al.*, 1996; REY & LOPES-BOTE, 2001). Outros estudos mostraram que o “status” de vitamina E também pode alterar o metabolismo do cobre, pois a ausência crônica de vitamina E pode gerar maior síntese de metalotioneínas em resposta ao estresse oxidativo (STANGL *et al.*, 2000). As metalotioneínas quelam os íons cobre protegendo as membranas dos possíveis danos

gerados pelo excesso deste metal o que, provavelmente, a vitamina E não realizaria suficientemente quando em concentrações muito baixas.

Foi observado um efeito pró-oxidante da vitamina E quando na presença de íons Cu, sob certas condições *in vitro*, a vitamina E reduz o Cu^{2+} a Cu^+ gerando radicais hidroxila (reações 5 e 6), porém esse efeito não foi observado *in vivo* (CHOW 1991, 2001; PROUDFOOT *et al.*, 1997).



1.3. Hipóxia

Águas com baixas concentrações de oxigênio são encontradas em ambientes tropicais devido a temperaturas constantemente altas e grandes quantidades de matéria orgânica. Em piscicultura não é diferente, pois oscilações nas concentrações de oxigênio na água podem ocorrer devido à grande quantidade de animais em tanques, matéria orgânica elevada ou também durante o processo de limpeza desses tanques.

A Amazônia, maior sistema de drenagem de água doce do mundo, abriga a maior diversidade de peixes de água doce (2500 espécies de quase todas as famílias conhecidas, ALMEIDA-VAL *et al.*, 1993). Suas águas são caracterizadas por temperatura alta com pouca variação anual e pelo conteúdo alto e estável de matéria orgânica que favorecem a proliferação de microrganismos, podendo resultar em condições de hipóxia (concentrações de O_2 dissolvido menores que o equilíbrio da água com o ar atmosférico) ou mesmo anóxia (ausência de O_2 dissolvido) como resultado da respiração de animais e plantas. Por isso a hipóxia é considerada uma situação comum para os organismos aquáticos habitantes da bacia Amazônica. Tais variações na

concentração de O₂ dissolvido estão diretamente relacionadas ao denominado “pulso de inundações” que ocorre anualmente na região (JUNK *et al.*, 1989) e caracterizam as águas da Amazônia como predominantemente hipóxicas.

Os peixes amazônicos possuem mecanismos que incluem modificações comportamentais (respiração aquática de superfície - ASR), morfológicas (respiração aérea), fisiológicas (depressão metabólica e ajustes na transferência de O₂) e bioquímicas que vão desde a depressão metabólica (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1993) até a alternância entre o metabolismo aeróbico e anaeróbico utilizando vias oxidativas e anaeróbicas (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1999) que permitem, até certo ponto, a sua sobrevivência em ambientes hipóxicos.

Adaptações morfológicas como a distensão dos lábios, presente principalmente na ordem Characiforme (BRAUM & JUNK, 1982) e bem descrita em *Colossoma macropomum* (tambaqui) (VAL 1995), *Myolossoma duriventris*, *Brycon erythropterus* e *Brycon melanopterus* facilitam a obtenção da camada superficial da água, mais oxigenada, durante a respiração na superfície da água (ASR) aumentando a oxigenação nas brânquias (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1993; VAL & ALMEIDA-VAL, 1995; VAL, 1996).

As respostas fisiológicas frente a redução nos níveis de oxigênio ocorrem via: (1) aumento da frequência ventilatória, volume ventilatório e redução na frequência cardíaca; (2) aumento no número de eritrócitos circulantes, concentração de hemoglobina e hematócrito; (3) aumento da afinidade da Hb pelo oxigênio ajustando a proporção de fosfatos orgânicos (NTP) e concentração de hemoglobina ([Hb]); (4) múltiplas hemoglobinas com diferentes propriedades funcionais; e (5) depressão do metabolismo (VAL, 1996). Os ajustes fisiológicos e bioquímicos favorecem o aumento na tomada de O₂ e transferência para os tecidos. Tais ajustes são acionados assim que o

animal detecta uma alteração ambiental via sistema sensorial ou via processos metabólicos (HOCHACHKA & SOMERO, 1984; WOOTONM, 1990).

Peixes oxi-reguladores são capazes de manter o aporte de O₂ ao organismo até a concentração crítica de O₂ a qual varia entre as espécies e, a partir dessa concentração a absorção deste gás diminui com a redução da sua concentração no ambiente. As respostas fisiológicas apresentadas por esses animais mantêm a concentração de oxigênio no sangue até que o custo do aumento da ventilação seja maior do que o ganho de oxigênio (HOCHACHKA, 1980; JENSEN *et al.*, 1993; FRITSCHÉ & NILSSON, 1993; JOBLING, 1994). Portanto, até a concentração crítica de O₂ determinada para cada espécie é esperado que as respostas fisiológicas e hematológicas à hipóxia mantenham o consumo de O₂ normal, no entanto esses ajustes implicam em maior gasto de energia, que é obtida a partir da dieta e de reservas, como glicogênio, proteínas e lipídios, presentes em tecidos como fígado e músculo dos peixes.

Os ajustes hematológicos frente a hipóxia envolvem aumento no hematócrito (Hct), hemoglobina do sangue ([Hb]), células vermelhas no sangue (RBC) e redução nos níveis de ATP e GTP e têm sido descritos em muitos peixes da Amazônia e outros ambientes hipóxicos (VAL *et al.*, 1990; VAL & ALMEIDA-VAL, 1995; VAL, 2000). Dessa forma, peixes com altas concentrações de NTP apresentam maior capacidade de regulação, pois podem reduzir a concentração de fosfatos ao aumentar o volume os eritrócitos (aumento do VCM) e assim regular a afinidade da Hb pelo oxigênio. Os peixes amazônicos, em geral, apresentam elevada concentração de NTP nos eritrócitos, o que permite adaptação e tolerância a períodos de hipóxia (VAL, 2000). Esses ajustes (aumento da Hb, RBC, Hct e redução de NTP) resultam em aumento na capacidade de captar O₂ nas brânquias e maior conteúdo de O₂ no sangue em peixes expostos a hipóxia (WEBER *et al.*, 1975; JENSEN *et al.*, 1993).

A utilização de variáveis hematológicas como [Hb] e Hct pode indicar as respostas dos peixes frente a situações de estresse como a hipóxia ambiental ou a presença de ambientes contaminados (DETHLOFF & BAIMAIER, 2001).

1.4. Metabolismo Intermediário

O metabolismo dos peixes pode ser alterado por diversos fatores, inclusive a hipóxia e contaminantes presentes na água ou na dieta. CARVALHO (2003) demonstrou o papel do cobre em excesso como mobilizador de estoques energéticos. O acúmulo de cobre ou vitamina E nos tecidos pode requerer maior demanda energética para desintoxicação, caso a concentração utilizada seja excessiva.

Os peixes são completamente dependentes do metabolismo aeróbico, exceto em breves períodos de anaerobiose como durante a natação de alta velocidade e oscilações na concentração de oxigênio dissolvido (VAL, 1995). A glicose é essencial para a manutenção do desempenho sob condições de oxigênio limitadas e a regulação entre metabolismo aeróbico e anaeróbico ocorre nas primeiras etapas de mobilização da glicose (DRIEDZIC & BAILEY, 1999) utilizando glicose ou glicogênio como substratos e lactato como produto final (VAN RAAIJ *et al.*, 1996). Em geral, espécies tolerantes a hipóxia são capazes de sobreviver utilizando, de forma anaeróbica as reservas de glicogênio presentes no fígado, coração e músculo vermelho (DUNN & HOCHACHKA, 1986) e são altamente dependentes dos carboidratos como fonte de energia (HAMAN *et al.*, 1997). No tambaqui a tolerância a hipóxia é, em parte, devido a obtenção de energia via metabolismo anaeróbico que pode ser observada pelo aumento no lactato no sangue e redução do glicogênio no músculo branco e do fígado quando expostos a 5mmHg durante 24h (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1993; RANTIN & KALININ, 1996; AFFONSO *et al.*, 2002). DUNN & HOCHACHKA (1986)

observaram aumento semelhante na concentração de lactato nos músculos, sangue e fígado de truta arco-íris submetida a hipóxia (20Torr) durante 3 horas, mostrando que essa é uma resposta utilizada por peixes expostos a hipóxia severa.

MUUSZE *et al.* (1998) expuseram *Astronotus ocellatus*, que apresenta respiração aérea facultativa, à hipóxia sem acesso a superfície e observaram que em hipóxia moderada há uma redução no metabolismo e em hipóxia severa ou anóxia há ativação da glicólise anaeróbica, o que demonstra que os peixes tolerantes a hipóxia podem apresentar as duas respostas (depressão metabólica e ativação do metabolismo anaeróbico) e que estas estão interligadas e freqüentemente presentes em peixes amazônicos (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1992, 1993, 1995).

Um indicativo de utilização da depressão metabólica ou hipometabolismo é a redução da ativação glicolítica e ausência de geração de lactato (HOCHACHKA & SOMERO, 1984; VAN RAAIJ *et al.*, 1996). A supressão metabólica associada à redução da glicólise anaeróbica pode permitir a sobrevivência dos peixes a hipóxia de longa duração, respostas estas que ocorrem freqüentemente em peixes amazônicos (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1992, 1993, 1995; VAL & ALMEIDA-VAL, 1995).

Estudos que evidenciam alterações nas defesas antioxidantes (DA) de peixes que vivem em ambientes nos quais ocorrem variações no nível de oxigênio dissolvido (OD), fator crítico para o metabolismo aeróbico e fonte de ERO, são escassos assim como estudos em relação as respostas metabólicas de peixes alimentados com dieta suplementada com vitamina E e cobre. A maioria estes estudos estão restritos a espécies de ambientes estuarinos (ROSS *et al.*, 2001, COOPER *et al.*, 2002, RITOLA *et al.*, 2002). Peixes de água doce estão rotineiramente expostos a variações na disponibilidade de oxigênio tanto em ambientes naturais quanto em sistemas de cultivo e as

conseqüências dessas alterações em relação às defesas antioxidantes ainda não são totalmente compreendidas, principalmente em espécies de ambiente tropicais. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto a hiperóxia mostrou um aumento na atividade da SOD (MARCON, 1996). Acará-açú (*Astronotus ocellatus*) não mostrou diferença na atividade dessa enzima (MARCON, 1996), entretanto, piapara (*Leporinus elongatus*) exposta a hipóxia apresentou um aumento significativo na atividade da SOD, mas nenhuma diferença na atividade das enzimas catalase, glutatona redutase e glutatona peroxidase (WILHELM FILHO *et al.*, 2005).

Condições de hipóxia também são encontradas em pisciculturas devido ao acúmulo de matéria orgânica dentre outros fatores. Diversos autores têm mostrado que a hipóxia pode reduzir o crescimento dos animais devido à menor ingestão de alimento e seu aproveitamento (CHABOT & DUTIL, 1999; WILHELM FILHO *et al.*, 2005). Dessa forma o OD e os nutrientes disponíveis na dieta são fatores importantes para a manutenção desses animais em cultivo sendo que os ajustes fisiológicos e hematológicos que esses animais utilizam para enfrentar condições adversas são vitais para sobrevivência e, em parte, para um crescimento adequado.

O matrinxã (*Brycon cephalus*), espécie encontrada na região amazônica é uma das mais promissoras para piscicultura (FRASCÁ-SCORVO *et al.*, 2001). A espécie apresenta grande potencial de crescimento, carne nobre, alta aceitabilidade de rações artificiais (GRAEF *et al.*, 1987) e grande tolerância às variações de temperatura (18 a 36°C) (GUIMARÃES & STORTI FILHO, 1997) o que permite seu cultivo em diferentes regiões do país. Considerando que o matrinxã é uma espécie proveniente da região amazônica é esperado que apresente tolerância a ambientes hipóxicos como os encontrados em seu ambiente natural e em pisciculturas.

2. Objetivos

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar se a suplementação da dieta com vitamina E e vitamina E + cobre contribui para diminuir o estresse oxidativo e alterar os ajustes metabólicos de matrinxã (*Brycon cephalus*) quando expostos a hipóxia ambiental em condições de cultivo.

Os objetivos específicos foram:

- a. Determinar as possíveis alterações nos parâmetros hematológicos e hematimétricos em *B. cephalus* alimentados com dieta suplementada com vitamina E e vitamina E e cobre em normóxia durante 30 dias e após exposição a hipóxia durante 24h;
- b. Determinar as concentrações dos intermediários metabólicos (glicose, lactato, piruvato, amônia e glicogênio) e proteínas totais no plasma, fígado e músculos branco e vermelho de *B. cephalus* alimentados com dieta suplementada com vitamina E e vitamina E e cobre em normóxia durante 30 dias e após exposição a hipóxia durante 24h;
- c. Determinar a concentração de hidroperóxidos (HP) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px) no plasma de *B. cephalus* alimentados com dieta suplementada com vitamina E e vitamina E e cobre em normóxia durante 30 dias e após exposição a hipóxia durante 24h;
- d. Determinar concentração hidroperóxidos (HP) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) no fígado, coração, músculo branco e vermelho e brânquias de *B. cephalus* alimentados com dieta suplementada com vitamina E e vitamina E e cobre em normóxia durante 30 dias e após exposição a hipóxia durante 24h.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material biológico

Exemplares jovens de matrinxã (*Brycon cephalus*) (Figura 2) foram fornecidos pela piscicultura Águas Claras (Mococa, SP, Brasil) e mantidos em 3 tanques de 500L (40 exemplares por tanque) com aeração [oxigênio dissolvido (OD) = 6,0 mgO₂/L] e renovação de água contínuas, temperatura (25 ± 1°C) constante e fotoperíodo artificial de claro : escuro 10 : 14 h durante 30 dias. Durante esse período os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9h e 17h) até a saciedade com ração comercial (Guabi®) que continha 36% de proteína bruta, 91,89% de matéria seca, 9,95% minerais, 1,33% de fibras e 4569,02 cal/g de energia total bruta.

A espécie *B. cephalus* (GÜNTHER, 1869) apresenta a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes; Subclasse: Actinopterygii; Infraclasse: Teleostei; Superordem: Ostariophysi; Ordem: Characiformes; Subordem: Characoidei; Família: Characidae; Gênero: *Brycon*; Espécie: *Brycon cephalus*.

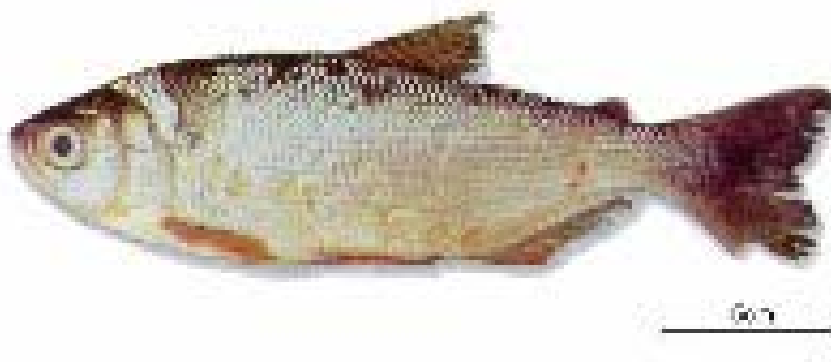


Figura 2. Exemplar de matrinxã, *Brycon cephalus*.

3.2. Protocolo Experimental

Após aclimação, os peixes [Massa corpórea ($M_B = 25 \pm 5$ g; Comprimento total (Lt) = $11,0 \pm 3,0$ cm) permaneceram nos mesmos tanques e foram alimentados, durante 30 dias, com ração Guabi® com e sem suplementação de cobre e/ou vitamina E formando os seguintes grupos: Co (controle - sem suplementação de cobre e vitamina E); E (suplementado somente com vitamina E); E+Cu (suplementado com vitamina E e cobre). Após esse período, a alimentação foi suspensa por 24h e, posteriormente dez animais foram retirados de cada tanque, anestesiados (benzocaína 0,01% - Synth®) e uma amostra de sangue coletada por punção caudal. Os animais foram sacrificados por secção medular e amostras de fígado, coração, brânquias, músculo branco e vermelho foram retiradas e congeladas em freezer – 80°C. Os tecidos foram utilizados para análise de HP e ensaio das enzimas antioxidantes e concentração dos intermediários metabólicos (exceto em coração e brânquias) glicose, lactato, piruvato, amônia, glicogênio e proteína.

Os animais remanescentes foram deixados 24 h em recuperação do estresse da coleta e, então, submetidos a hipóxia constituindo os seguintes grupos Co+Hpx (controle e exposição a hipóxia); E+Hpx (suplementado com vitamina E e exposição a hipóxia); E+Cu+Hpx (suplementado com vitamina E e cobre e exposição a hipóxia). A redução da concentração de O₂ até a concentração crítica de O₂ determinada para a espécie (OD = 2,87 mgO₂/L; Boijink, dados não publicados) foi gradual (3h) e realizada com a remoção da oxigenação dos tanques e introdução de nitrogênio. Após a concentração crítica de O₂ ter sido alcançada (OD = $2,71 \pm 0,77$ mgO₂/L), os animais permaneceram durante 24 h em hipóxia sendo a oxigenação mantida com o controle da aeração dos tanques e um oxímetro YSI 55. Dez animais de cada tanque foram

removidos aleatoriamente para coleta de amostras de sangue, fígado, coração, brânquias e músculos branco e vermelho congelados em freezer – 80°C.

Uma alíquota de sangue total foi utilizada para determinação dos parâmetros hematológicos e o sangue remanescente foi centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada Hermle Z323K e o plasma foi separado em alíquotas para análise de glicose, lactato, piruvato, amônia, proteína e concentração de HP, da SOD e da GSH-Px. Os tecidos coletados foram homogeneizados e processados de acordo com a análise a ser efetuada.

3.3. Dieta

A ração comercial continha 20 mg Cu/kg e 188 mg vitamina E/kg de ração e foi suplementada com cobre (CuSO₄, Synth®) e vitamina E (acetato de α -tocoferol Roche Rovimix E50 SD, Roche®), para a obtenção de 44 e 281 mg/kg, respectivamente (Tabela 1). As rações suplementadas foram utilizadas para a alimentação dos grupos E e E+Cu. As concentrações utilizadas para suplementação da ração foram baseadas em estudos que mostraram a eficiência da suplementação alimentar desses antioxidantes em outras espécies de peixes (NRC, 1993).

Para obter a dieta suplementada com vitamina E foi utilizada concentração de vitamina E a fim de complementar os 188mg de vitamina E/kg de ração já presente na dieta. A vitamina E foi diluída a óleo vegetal numa razão de 5% (óleo / quantidade de ração) e misturada à ração até que todos os grãos de ração estivessem cobertos de óleo. Para suplementar a ração com cobre e vitamina E o cobre foi diluído a água e misturado a ração, que depois foi coberta com óleo rico em vitamina E. A ração controle também foi misturada ao óleo sem nenhuma suplementação.

Tabela 1. Concentração (mg/kg de ração) de cobre, vitamina E, bromo, ferro, manganês e zinco constituintes da ração controle (Co) e das rações suplementadas com vitamina E (E) e vitamina e cobre (E+Cu).

	Cobre (Cu)	Bromo (B)	Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Zinco (Zn)	Vitamina E
Ração sem cobre e vitamina E (Co)	21,42	8,96	397,55	88,73	134,04	188,0
Ração com vitamina E (E)	21,42	8,96	397,55	88,73	134,04	281,0
Ração com cobre e vitamina E (E+Cu)	44,31	7,18	416,51	88,13	141,91	281,0

3.4. Análises sangüíneas

Os parâmetros hematológicos hematócrito (Hct), número de eritrócitos (RBC) e a concentração de hemoglobina ([Hb]) foram analisados imediatamente após a coleta de sangue.

A determinação de hematócrito (Hct=%) foi realizada utilizando o método de microhematócrito em centrífuga FANEN modelo 207/N, a concentração de hemoglobina (Hb = g/dL) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina com leitura da absorbância em 540 nm em espectrofotômetro Spectronic Genesys 5. A curva padrão foi obtida utilizando-se padrão de hemoglobina da Labtest® (Labtest, cat. 47).

A contagem de eritrócitos (RBC = 10^6 eritrócitos mm^{-3}) foi efetuada utilizando a câmara de Neubauer após diluição do sangue em solução de formol-citrato (3,8% citrato de sódio e 2% formalina) sob microscópio de luz Olympus CBA-K.

Os índices hematimétricos foram calculados a partir dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos utilizando as seguintes fórmulas:

VCM (Volume corpuscular médio= μm^3) = Hct.10/RBC

HCM (Hemoglobina corpuscular média= pg.cél^{-1}) = Hb.10/RBC

CHCM (Concentração de hemoglobina corpuscular média=%) = Hb.100/Hct

3.5. Determinação dos Intermediários Metabólicos

Para as determinações de concentração de glicose, lactato, piruvato e amônia foi utilizado 100 μL de plasma em 900 μL ácido tricloroacético (TCA) 20% seguido de centrifugação a 12000 rpm por 3 minutos. Para os tecidos foi utilizado 50mg de fígado e 100mg de músculo branco e vermelho. Os tecidos foram homogeneizados em 1mL de TCA 20% em homogeneizador Turratec TE-102 (Tecnal) em gelo seguido de centrifugação a 3000 rpm por 3 minutos. Tecidos e plasma foram centrifugados em centrífuga refrigerada HERMLE-Z323K e o sobrenadante foi utilizado para as determinações anteriormente citadas.

3.5.1. Concentração de glicose

A concentração de glicose no plasma e nos tecidos foi determinada segundo o método de DUBOIS et al (1956). À cada amostra (100 μL do plasma, 2 μL do fígado e 50 μL de músculo branco e vermelho) foi adicionada água destilada até completar 500 μL seguido da adição de 500 μL de fenol 4,1% e 2,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). A concentração de glicose foi determinada utilizando solução padrão de glicose 100 nmol em 480nm e foi expressa em μmol de glicose/mg de tecido ou mL de plasma.

3.5.2. Concentração de lactato

A concentração de lactato no plasma e tecidos foi determinada segundo o método de HARROWER & BROWN (1972) que se baseia na formação de um

complexo entre o lactato e o sulfato de cobre (CuSO_4), sendo o lactato revelado pelo *p*-fenilfenol e H_2SO_4 . Para as determinações o plasma (50 μL) ou homogeneizado de tecidos (20 μL de fígado e músculo vermelho e 10 μL de músculo branco) foram diluídos em água destilada até completar 500 μL , em seguida foi adicionado 20 μL de CuSO_4 4% e 3,5 mL de H_2SO_4 concentrado. A solução foi, então, fervida durante 5 minutos e após o resfriamento foi adicionado 80 μL de *p*-fenilfenol e agitado em vórtex. Após 1 hora em descanso foi efetuada nova fervura de 90 segundos e a leitura foi realizada em 570 nm. Padrão de 100 nmol de ácido láctico (Sigma ®) foi utilizado para determinação da concentração de lactato μmol de lactato/mg de tecido ou mL de plasma.

3.5.3. Concentração de piruvato

O piruvato foi determinado segundo método de LU (1939) pela reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH), em que o plasma (400 μL de amostra) ou homogeneizado de tecido (500 μL de fígado e músculo vermelho e 400 μL de músculo branco) são diluídos em água destilada até completar 500 μL seguido da adição de 250 μL de DNPH e posterior manutenção em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados a reação 3mL de NaOH (1,3 N) e a leitura foi efetuada em 440 nm. A concentração de piruvato foi determinada utilizando-se solução padrão de 100 nmol de piruvato de sódio (Sigma ®) e foi expressa em μmol de piruvato/mg de tecido ou mL de plasma.

3.5.4. Concentração de amônia

A concentração de amônia foi determinada segundo o método de nesslerização, (adaptado por GENTZKOW & MANSEN, 1942) que consiste em adicionar 500 μL do reagente de Nessler aos tubos contendo as amostras (300 μL de plasma, 100 μL de fígado, músculo branco e vermelho) diluídas em água destilada até completar 2000 μL e

posterior permanência em repouso durante 20min. A leitura foi efetuada em 420nm. A concentração de amônia foi determinada utilizando-se solução padrão de 100 nmol de NH_4 e foi expressa em μmol de amônia/mg de tecido ou mL de plasma.

3.6. Determinação da concentração de glicogênio

Para as determinações de glicogênio 50mg de fígado ou 100mg de músculo branco e vermelho foram dissolvidas em 1 mL KOH 6N durante 5 minutos em água fervente. Foi utilizado o método de DUBOIS *et al.* (1956) modificado por BIDINOTO *et al.* (1997). Após transferência de 250 μL do homogeneizado para um tubo de ensaio, foi adicionado 3 mL de etanol PA e 100 μL de K_2SO_4 . O tubo foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi re-suspendido em 2,5 mL de água destilada e agitado. Foram utilizados 50 μL do precipitado do fígado para completar o volume de 500 μL com água destilada e 500 μL dos músculos branco e vermelho aos quais foi adicionado 500 μL de fenol 4,1% e 2,0 mL de H_2SO_4 . A concentração de glicogênio foi determinada utilizando solução padrão de glicose 100 nmol e foi expressa em μmol de glicosil-glicose/mg de tecido.

Todas as leituras de intermediários e glicogênio foram determinadas em espectrofotômetro SPECTRONIC GENESYS 5.

3.7. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína foi efetuada segundo o método descrito por Bradford (1976). À 10 μL de amostra previamente diluída (1:50 para o plasma e 1:10 para os tecidos) foram adicionados a 200 μL de reagente de Bradford. A curva padrão foi obtida utilizando-se padrão de albumina bovina sérica (BSA)

(Sigma®). As leituras foram realizadas em Microplate Reader MRX TC Dynex Technologies a 595 nm.

3.8. Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) na razão 1:10 utilizando homogeneizador Turrtec TE-102 (Tecnal) e centrifugados a 10000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima para análises enzimáticas (SOD, CAT e GSH-Px) e de HP.

3.8.1. Concentração de hidroperóxidos (HP)

Para determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio (HP) o homogenado dos tecidos e o plasma foram desproteinizados com TCA 10% e centrifugado a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente (25°C). Foi utilizada a metodologia descrita por JIANG *et al.* (1991), em que o Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal) sofre oxidação formando o Fe^{3+} que reage com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Spectronic Genesys 5 a 560 nm e os resultados foram expressos como nmol/g tecido e nmol/mL de plasma.

3.8.2. Atividade da superóxido dismutase (SOD – E.C. 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase total (SOD) foi determinada segundo o método de SPITZ & OBERLEY (1989) tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução do NBT (nitroblue-tetrazólio) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (tampão carbonato pH 10,2) em amostras diluídas em salina 1% (30% para tecidos e 10% para plasma). A reação foi realizada no escuro

devido a fotossensibilidade de alguns reagentes. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e a concentração foi expressa em unidade (U = quantidade necessária para gerar 50% de inibição da redução do NBT) por mg de proteína (USOD/mg de pt).

3.8.3. Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px – E.C. 1.11.1.9)

A atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) foi determinada de acordo com método descrito por HAFEMAN *et al.* (1974) utilizando-se 10uL de amostra, 100uL de GSH 2 mM, 100uL de tampão fosfato de sódio contendo EDTA 0,4 mM (pH 7,0) e 50uL de azida sódica 0,01 M (para inibir a catalase). Em seguida os tubos ficaram em banho-maria (37oC) por 5 minutos e foi adicionado H₂O₂. Dessa mistura foi retirado 100uL para adicionar em 400uL de reagente de precipitação e centrifugar em 3000 rpm por 10 min. Após centrifugação foi adicionado ao sobrenadante tampão fosfato de sódio 0,4M (pH7,0) e DTNB e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm em temperatura ambiente e expressa em nmol/mg pt.

3.8.4. Atividade da catalase (CAT – E.C. 1.11.1.6)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada em tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM (pH 7,0) utilizando 500 µL de amostra na diluição de 1:10 e 500 µL de peróxido de hidrogênio (30%) diluído no mesmo tampão. As leituras foram feitas em intervalos de 15 segundos em 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades de Bergmeyer (UB/mg proteína) (Aebi, 1974). Uma unidade de CAT é a quantidade de enzima que decompõe 1µmol de H₂O₂ por minuto a 25°C e a fórmula para cálculo é:

$$UB = \frac{(2,3/t).log (E1/E2)}{0,00693}$$

onde: t = tempo de 15 segundos para leitura ; $E1$ = leitura no tempo 1; $E2$ = leitura no tempo 2. K = constante = 0,00693

3.9. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SigmaStat® 2.0. Para determinar se houve interação entre os duas variáveis Dieta e Oxigênio dissolvido (OD) foi utilizado o teste two-way ANOVA. Sempre que foi detectada diferença entre os tratamentos ou interação entre eles foi aplicado o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para se determinar onde ocorreram as diferenças ou as interações.

4. Resultados

Não houve mortalidade de animais durante o período de alimentação ou hipóxia. Durante os 30 dias em que os peixes foram alimentados com a dieta diferenciada, tanto com a vitamina E quanto com vitamina E + cobre, não foi observada nenhuma alteração comportamental ou preferência por alguma das dietas. Os animais permaneceram ativos e nadando por toda a coluna d'água. Somente durante as 24 horas de hipóxia os animais mostraram-se menos ativos e permaneceram preferencialmente na porção superior, mas sem realizar ASR ou formar lábios.

4.1. Efeitos nos parâmetros hematológicos

Os resultados dos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos estão apresentados na tabela 2. A suplementação da dieta com vitamina E (E) e com vitamina E+ cobre (E+Cu) induziu alterações nas variáveis hematológicas com exceção do VCM. No grupo cuja dieta foi suplementada com vitamina E+Nox ocorreu aumento no Hct enquanto que nos animais cuja dieta foi suplementada com E+Cu ocorreu aumento na [Hb] e CHCM.

Dos parâmetros hematológicos analisados em normóxia o Hct e a [Hb] foram maiores em E+Nox e E+Cu+Nox, respectivamente, e a dieta com vitamina E + cobre aumentou o CHCM dos animais.

A exposição a hipóxia ambiental interferiu no efeito da dieta. Animais alimentados com dieta não suplementada e expostos a hipóxia mostraram um aumento no Hct e CHCM em relação aqueles mantidos em normóxia. Nos animais alimentados com dieta suplementada com vitamina E os valores médios dos parâmetros hematológicos, Hct, [Hb] e RBC, foram significativamente menores que os dos animais

alimentados com a mesma dieta, em normóxia, e menores do que os dos animais alimentados com as dietas Co e E+Cu, em hipóxia. Entretanto, nos animais alimentados com dieta suplementada com vitamina E + cobre (E+Cu) o aumento no RBC foi acompanhado por um aumento da [Hb] e CHCM em relação aos animais em normóxia, alimentados com a mesma dieta.

Tabela 2. Valores médios (\pm EPM) hematológicos de matrinxã ($n= 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$). Sempre que houver interação entre os fatores dieta e OD: Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p<0,05$). (ns) não significativo

	Hct (%)		[Hb] g . dL⁻¹		RBC 10⁶ · mm⁻³		VCM μm^3		HCM pg.cél⁻¹		CHCM %	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	35,75	$\pm 0,85$ ^{aA}	11,28	$\pm 0,29$ ^{aA}	2,23	$\pm 0,08$ ^{aA}	159,47	$\pm 6,62$	51,64	$\pm 2,14$	26,60	$\pm 0,71$ ^{aA}
E+Nox	41,50	$\pm 1,07$ ^{bA}	12,19	$\pm 0,31$ ^{aA}	2,42	$\pm 0,08$ ^{aA}	165,39	$\pm 7,25$	51,18	$\pm 2,14$	29,15	$\pm 0,77$ ^{aA}
E+Cu+Nox	38,07	$\pm 0,90$ ^{aA}	13,17	$\pm 0,31$ ^{bA}	2,46	$\pm 0,09$ ^{aA}	148,70	$\pm 6,62$	48,00	$\pm 2,14$	33,39	$\pm 0,71$ ^{bA}
Co+Hpx	42,57	$\pm 0,90$ ^{aB}	12,08	$\pm 0,34$ ^{aA}	2,22	$\pm 0,09$ ^{aA}	152,96	$\pm 7,25$	51,90	$\pm 1,81$	29,28	$\pm 0,77$ ^{aB}
E+Hpx	29,80	$\pm 1,07$ ^{bB}	9,51	$\pm 0,34$ ^{bB}	2,10	$\pm 0,08$ ^{aB}	146,02	$\pm 7,25$	45,94	$\pm 1,81$	32,44	$\pm 0,70$ ^{bB}
E+Cu+Hpx	40,67	$\pm 0,98$ ^{aA}	12,08	$\pm 0,34$ ^{aB}	2,83	$\pm 0,09$ ^{bB}	149,14	$\pm 5,12$	42,07	$\pm 1,96$	31,04	$\pm 0,84$ ^{abB}
ANOVA Dois fatores ($p < 0,05$)												
<i>Dieta</i>	Co = E+Cu > E		Co < E < E+Cu		Co = E < E+Cu		ns		Co > E+Cu		Co = E < E+Cu	
<i>OD</i>	ns		Nox > Hpx		ns		ns		Nox > Hpx		ns	
<i>Dieta X OD</i>	<0,001		<0,001		0,001		ns		ns		0,001	

4.2. Efeitos Metabólicos

4.2.1. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no plasma

As concentrações de glicose plasmática (Tabela 3) não apresentaram interação entre dieta e OD, entretanto foi detectada interação entre esses dois fatores na concentração de piruvato e a amônia. A concentração de glicose plasmática foi mais alta no grupo alimentado com dieta suplementada com vitamina E enquanto que a concentração de lactato foi maior no grupo alimentado com cobre e vitamina E. As concentrações de piruvato e amônia não foram significativamente diferentes em relação às dietas nos animais em normóxia. A exposição a hipóxia induziu um aumento na concentração de glicose, redução na de lactato, aumento da concentração de piruvato, exceto no grupo controle, e da concentração de amônia. Embora tenha ocorrido aumento da concentração de amônia em todos os grupos expostos a hipóxia em relação aos mantidos em normóxia, o grupo Co+Hpx, foi aquele no qual o aumento foi menor.

4.2.2. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no fígado

Não houve interação entre a dieta e OD na concentração de glicose e lactato no fígado. O grupo alimentado com dieta suplementada com cobre e vitamina E, em normóxia apresentou os maiores valores de concentração dos metabólitos analisados.

A concentração de piruvato no fígado aumentou com a suplementação da dieta nos grupos mantidos em normóxia e no E+Cu+Hpx em relação aos grupos expostos a hipóxia. A amônia, no fígado, também foi maior nos animais alimentados com dieta suplementada e diminuiu no grupo E+Hpx em relação aos grupos submetidos a hipóxia. Em hipóxia houve aumento das concentrações de piruvato e amônia nos animais alimentados com dieta controle.

4.2.3. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no músculo vermelho

As concentrações de glicose e piruvato no músculo vermelho (Tabela 5) não apresentaram interações entre as dietas e OD. O piruvato foi menor nos animais controle e a glicose foi maior nos animais alimentados com dieta suplementada com cobre e vitamina E. A concentração de amônia foi maior nos animais alimentados com dieta suplementada e expostos a hipóxia.

O lactato do músculo vermelho aumentou no grupo E+Cu+Nox dentre os mantidos em normóxia e no grupo E+Hpx em relação à mesma dieta sem hipóxia. A amônia caiu no grupo E+Nox em relação aos outros em normóxia e aumentou no E+Cu+Hpx em relação aos submetidos a hipóxia. Os animais mantidos em normóxia apresentaram menor concentração de amônia do que os expostos a hipóxia quando alimentados com dieta suplementada.

4.2.4. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no músculo branco

Assim como no músculo vermelho (Tabela 5) no músculo branco (Tabela 6) as concentrações de glicose e piruvato não mostraram interação entre dieta e OD. A concentração de amônia no músculo branco foi maior no grupo alimentado com dieta rica em vitamina E e intermediário na com cobre e vitamina E.

Na dieta suplementada com vitamina E e cobre houve aumento da concentração de lactato nos animais em Nox. A concentração de amônia no músculo branco aumentou no grupo E+Nox, em relação aos outros grupos em normóxia. Em hipóxia houve diminuição na concentração de amônia no grupo alimentado com dieta enriquecida com vitamina E.

4.2.5. Concentrações de glicogênio no fígado e músculos branco e vermelho

As concentrações de glicogênio (Tabela 7) no fígado e músculo vermelho de matrinxã não apresentaram interação entre as dietas e OD utilizadas. As concentrações de glicogênio nos animais alimentados com dietas suplementadas com vitamina E e vitamina E + cobre e expostos a hipóxia foram menores no fígado e maiores no músculo branco que no grupo controle. O nível de glicogênio no músculo vermelho aumentou na dieta E+Cu. Em hipóxia os níveis de glicogênio foram menores no fígado em relação ao grupo mantido em normóxia.

4.2.6. Concentrações de proteína no plasma, fígado e músculos branco e vermelho

A concentração de proteína (Tabela 8) não mostrou interação entre os fatores dieta e OD nos tecidos analisados. No fígado a dieta rica em vitamina E e cobre diminuiu a concentração de proteína, enquanto que no músculo vermelho as concentrações foram crescentes com adição de vitamina E e vitamina E + cobre.

Tabela 3. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no plasma de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo

Tratamentos	Plasma							
	Glicose ($\mu\text{mol/ml}$ de plasma)		Lactato ($\mu\text{mol/ml}$ de plasma)		Piruvato ($\mu\text{mol/ml}$ de plasma)		Amônia ($\mu\text{mol/ml}$ de plasma)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	0,558	± 0,030	0,351	± 0,049	0,020	± 0,001 ^{aA}	0,656	± 0,026 ^{aA}
E+Nox	0,722	± 0,036	0,496	± 0,057	0,019	± 0,002 ^{aA}	0,660	± 0,035 ^{aA}
E+Cu+Nox	0,589	± 0,027	0,581	± 0,044	0,018	± 0,001 ^{aA}	0,621	± 0,031 ^{aA}
Co+Hpx	0,709	± 0,032	0,348	± 0,040	0,022	± 0,002 ^{aA}	0,739	± 0,028 ^{aB}
E+Hpx	0,725	± 0,032	0,323	± 0,049	0,059	± 0,002 ^{bB}	0,982	± 0,035 ^{bB}
E+Cu+Hpx	0,728	± 0,032	0,436	± 0,040	0,026	± 0,002 ^{aB}	1,003	± 0,035 ^{bB}
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	Co < E		Co < E+Cu		Co = E+Cu < E		Co < E = E+Cu	
<i>OD</i>	Nox < Hpx		Nox > Hpx		Nox < Hpx		Nox < Hpx	
<i>Dieta X OD</i>	ns		ns		<0,001		<0,001	

Tabela 4. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no fígado de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo

Tratamentos	Fígado							
	Glicose ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Lactato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Piruvato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Amônia ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	301,16	$\pm 30,73$	26,41	$\pm 1,85$	0,45	$\pm 0,02$ ^{aA}	41,45	$\pm 2,60$ ^{aA}
E+Nox	320,46	$\pm 30,73$	27,32	$\pm 1,85$	0,57	$\pm 0,02$ ^{bA}	52,19	$\pm 2,39$ ^{bA}
E+Cu+Nox	425,00	$\pm 28,06$	29,97	$\pm 1,85$	0,62	$\pm 0,02$ ^{bA}	53,80	$\pm 2,83$ ^{bA}
Co+Hpx	302,55	$\pm 28,06$	29,16	$\pm 2,07$	0,54	$\pm 0,02$ ^{aB}	67,52	$\pm 2,83$ ^{aB}
E+Hpx	247,48	$\pm 30,73$	23,87	$\pm 1,85$	0,52	$\pm 0,02$ ^{aA}	45,50	$\pm 3,16$ ^{bA}
E+Cu+Hpx	379,50	$\pm 34,61$	28,61	$\pm 2,07$	0,63	$\pm 0,02$ ^{bA}	58,41	$\pm 2,83$ ^{aA}
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	Co < E+Cu		ns		Co < E < E+Cu		E < E+Cu	
<i>OD</i>	ns		ns		ns		Nox < Hpx	
<i>Dieta X OD</i>	ns		ns		0,002		<0,001	

Tabela 5. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no músculo vermelho de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios ± EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Músculo Vermelho							
	Glicose ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Lactato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Piruvato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Amônia ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	21,14	± 1,38	24,93	± 2,62 ^{aA}	0,13	± 0,02	16,06	± 0,57 ^{aA}
E+Nox	20,18	± 1,51	22,48	± 2,62 ^{aA}	0,17	± 0,02	13,17	± 0,57 ^{bA}
E+Cu+Nox	27,32	± 1,51	36,10	± 2,39 ^{bA}	0,27	± 0,02	15,32	± 0,48 ^{aA}
Co+Hpx	22,81	± 1,38	24,41	± 2,62 ^{aA}	0,13	± 0,02	15,06	± 0,53 ^{aA}
E+Hpx	24,33	± 1,51	27,41	± 2,62 ^{aB}	0,22	± 0,02	16,10	± 0,48 ^{aB}
E+Cu+Hpx	25,49	± 1,38	21,60	± 2,62 ^{aA}	0,24	± 0,02	18,74	± 0,52 ^{bB}
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	Co = E < E+Cu		ns		Co < E = E+Cu		Co = E < E+Cu	
<i>OD</i>	ns		ns		ns		Nox < Hpx	
<i>Dieta X OD</i>	ns		0,002		ns		<0,001	

Tabela 6. Concentrações de glicose, lactato, piruvato e amônia no músculo branco de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Músculo Branco							
	Glicose ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Lactato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Piruvato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)		Amônia ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	25,01	$\pm 0,71$	43,26	$\pm 4,98$ ^{abA}	0,15	$\pm 0,006$	22,52	$\pm 0,56$ ^{aA}
E+Nox	25,46	$\pm 0,83$	31,45	$\pm 4,98$ ^{aA}	0,15	$\pm 0,007$	27,83	$\pm 0,63$ ^{bA}
E+Cu+Nox	25,09	$\pm 0,66$	54,76	$\pm 4,98$ ^{bA}	0,16	$\pm 0,006$	24,49	$\pm 0,56$ ^{aA}
Co+Hpx	21,39	$\pm 0,76$	34,57	$\pm 4,54$ ^{aA}	0,12	$\pm 0,007$	21,42	$\pm 0,56$ ^{aA}
E+Hpx	22,79	$\pm 0,76$	43,25	$\pm 4,98$ ^{aA}	0,12	$\pm 0,006$	24,46	$\pm 0,47$ ^{bB}
E+Cu+Hpx	24,71	$\pm 0,71$	39,63	$\pm 4,54$ ^{aA}	0,14	$\pm 0,006$	24,41	$\pm 0,56$ ^{bA}
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	ns		ns		ns		Co < E+Cu < E	
<i>OD</i>	Nox > Hpx		ns		Nox > Hpx		Nox > Hpx	
<i>Dieta X OD</i>	ns		0,028		ns		0,021	

Tabela 7. Concentrações de glicogênio no fígado e músculos branco e vermelho de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Glicogênio					
	Fígado (μmol de glicosil glicose/ mg de tecido)		Músculo Branco (μmol de glicosil glicose/ mg de tecido)		Músculo Vermelho (μmol de glicosil glicose/ mg de tecido)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	263,61	$\pm 18,56$	13,68	$\pm 0,55$ ^{aA}	15,15	$\pm 1,31$
E+Nox	214,30	$\pm 18,56$	14,62	$\pm 0,60$ ^{aA}	14,80	$\pm 1,44$
E+Cu+Nox	184,74	$\pm 18,56$	14,74	$\pm 0,60$ ^{aA}	20,99	$\pm 1,44$
Co+Hpx	248,23	$\pm 18,56$	12,11	$\pm 0,55$ ^{aA}	13,25	$\pm 1,44$
E+Hpx	117,70	$\pm 18,56$	15,99	$\pm 0,60$ ^{bA}	18,53	$\pm 1,44$
E+Cu+Hpx	157,47	$\pm 18,56$	15,87	$\pm 0,55$ ^{bA}	19,67	$\pm 1,31$
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)						
<i>Dieta</i>	Co > E = E+Cu		Co < E = E+Cu		Co = E < E+Cu	
<i>OD</i>	Nox > Hpx		ns		ns	
<i>Dieta X OD</i>	ns		0,026		ns	

Tabela 8. Concentrações de proteína no fígado e músculos branco e vermelho de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Proteína							
	Plasma (mg/mL de plasma)		Fígado (mg pt/g tecido)		Músculo Branco (mg pt/g tecido)		Músculo Vermelho (mg pt/g tecido)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	13,19	$\pm 0,59$	36,35	$\pm 2,26$	20,37	$\pm 1,27$	27,91	$\pm 1,72$
E+Nox	12,77	$\pm 0,64$	36,03	$\pm 2,48$	15,64	$\pm 1,16$	36,05	$\pm 1,92$
E+Cu+Nox	12,06	$\pm 0,64$	30,34	$\pm 2,48$	20,44	$\pm 1,27$	40,65	$\pm 1,45$
Co+Hpx	13,14	$\pm 0,59$	35,56	$\pm 2,09$	17,07	$\pm 1,64$	31,47	$\pm 1,72$
E+Hpx	12,64	$\pm 0,59$	36,87	$\pm 2,77$	17,24	$\pm 1,16$	35,96	$\pm 1,57$
E+Cu+Hpx	13,22	$\pm 0,54$	21,24	$\pm 3,20$	17,05	$\pm 1,42$	39,93	$\pm 1,57$
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	ns		Co = E > E+Cu		ns		<0,001	
<i>OD</i>	ns		ns		ns		ns	
<i>Dieta X OD</i>	ns		ns		ns		ns	

4.3. Efeitos nos parâmetros de estresse oxidativo

4.3.1. Concentração de HP e atividade de SOD e GSH-Px no plasma

No plasma (Tabela 9) de matrinxã a concentração de HP não foi alterada com a dieta e aumentaram após exposição a hipóxia, mas não apresentaram interação entre dieta fornecida e OD, o contrário ocorreu em relação a atividade da SOD e da GSH-Px.

A atividade da SOD aumentou no grupo E+Hpx em relação ao grupo E e aos grupos submetidos a hipóxia. A atividade da GSH-Px diminuiu no grupo E+Cu dentre os animais mantidos em normóxia e diminuiu no grupo Co+Hpx dentre os submetidos a hipóxia. A atividade da GSH-Px diminuiu em Co+Hpx e aumentou em E+Cu+Hpx em relação aos mantidos em normóxia e em normóxia foi menor no grupo E+Cu+Nox.

4.3.2. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT no fígado

Com exceção da atividade da CAT, não houve interação entre dieta e concentração de OD em todos os parâmetros analisados (Tabela 10). A suplementação da dieta não alterou a atividade enzimática e a presença da hipóxia aumentou a atividade da SOD e da CAT. A única interação entre os fatores dieta e OD foi observada no aumento da CAT do grupo E+Cu+Hpx em relação ao mantido em normóxia.

4.3.3. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT nas brânquias

Nas brânquias (Tabela 11) não houve interação entre a dieta e OD. A atividade da SOD diminuiu com a suplementação da dieta e a exposição a hipóxia reduziu a atividade dessa enzima em todos os grupos.

4.3.4. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT no coração

Os níveis de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT do coração (Tabela 12) mostraram interação entre dieta e OD. A concentração de HP no coração dos animais, em normóxia, não foram diferentes em função da dieta, entretanto quando submetido a hipóxia os animais alimentados com dieta suplementada com vitamina E mostraram menor concentração de HP em relação aos demais grupos.

O efeito da dieta na concentração das enzimas antioxidantes SOD, GSH-Px mostrou que a concentração da SOD não foi alterada em animais do grupo Co+Nox e E+Nox entretanto a concentração de GSH-Px foi diminuída nos animais do grupo E+Nox. A concentração da SOD foi maior no grupo E+Cu+Nox e a atividade da CAT não foi alterada nos animais mantidos em normóxia. Após exposição a hipóxia a concentração da SOD foi maior no grupo E+Hpx e significativamente mais alta em relação ao mesmo grupo em normóxia, a concentração de GSH-Px aumentou em relação ao mesmo grupo em normóxia mas não foi diferente dos demais grupos em hipóxia. A atividade da CAT em hipóxia foi maior no grupo alimentado com dieta suplementada com vitamina E e cobre e maior em relação aos grupos mantidos em normóxia.

4.3.5. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT no músculo vermelho

Houve interação na concentração de HP e atividade da SOD, GSH-Px e CAT do músculo vermelho (Tabela 13) entre dieta e OD. Na dieta suplementada com vitamina E (E+Hpx) houve diminuição no HP em hipóxia.

A atividade da SOD e da CAT foram menores no grupo alimentado com dieta suplementada com vitamina E e cobre (E+Cu+Nox), em normóxia. Em relação aos

valores dos grupos em normóxia, a hipóxia induziu uma diminuição significativa da atividade da SOD no grupo controle e aumentou no grupo E+Cu+Hpx enquanto que a atividade da CAT diminuiu nos grupos Co+Hpx e E+Hpx e aumentou no grupo E+Cu+Hpx. A atividade da GSH-Px, em normóxia, não foi alterada em função da suplementação alimentar, mas, em hipóxia, foi significativamente menor no grupo E+Hpx em relação ao grupo E+Cu+Hpx. No grupo submetido a hipóxia (E+Cu+Hpx) a atividade da GSH-Px foi maior em relação ao grupo E+Cu.

4.3.6. Concentração de HP e atividade de SOD, GSH-Px e CAT no músculo branco

No músculo branco (Tabela 14) não houve interação entre dieta e OD na concentração de HP. A concentração de HP foi menor nos animais alimentados com dieta suplementada com vitamina E em normóxia e hipóxia.

A atividade da SOD foi maior no grupo alimentado com vitamina E+Nox e diminuiu quando esse grupo foi exposto a hipóxia. Em normóxia, a atividade da CAT foi maior no grupo E+Nox e menor no grupo E+Cu+Nox.

Nos animais expostos a hipóxia, a atividade da CAT aumentou no grupo controle e diminuiu nos alimentados com vitamina E. Em hipóxia, a dieta suplementada com E+Cu aumentou a atividade da GSH-Px e reduziu no alimentado com vitamina E, e em normóxia, diminuiu no grupo E+Cu.

Tabela 9. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GSH-Px) e concentração de hidroperóxidos (HP) no plasma de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Plasma							
	HP (nmol/mg de tecido)		SOD (USOD/ mg pt)		GSH-Px (nmol/mg pt)			
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM		
Co+Nox	20,66	$\pm 0,73$	3297,42	$\pm 126,48$	^{aA}	25,52	$\pm 1,54$	^{aA}
E+Nox	19,94	$\pm 0,73$	3176,95	$\pm 141,41$	^{aA}	21,33	$\pm 1,69$	^{aA}
E+Cu+Nox	20,40	$\pm 0,67$	3082,71	$\pm 141,41$	^{aA}	16,45	$\pm 1,69$	^{bA}
Co+Hpx	21,77	$\pm 0,73$	3018,54	$\pm 115,46$	^{aA}	17,39	$\pm 1,69$	^{aB}
E+Hpx	20,91	$\pm 0,63$	3703,43	$\pm 126,49$	^{bB}	21,75	$\pm 1,54$	^{aA}
E+Cu+Hpx	22,11	$\pm 0,67$	3032,52	$\pm 106,90$	^{aA}	21,39	$\pm 1,69$	^{aB}
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	ns		E > E+Cu			ns		
<i>OD</i>	Nox < Hpx		ns			ns		
<i>Dieta X OD</i>	ns		0,013			0,002		

Tabela 10. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) no fígado de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Fígado							
	HP (nmol/mg de tecido)		SOD (USOD/ mg pt)		GSH-Px (nmol/mg pt)		CAT (UB/mg pt)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	185,91	$\pm 3,06$	365,29	$\pm 16,45$	16,17	$\pm 1,90$	17,15	$\pm 1,22$ ^{aA}
E+Nox	190,60	$\pm 3,31$	381,36	$\pm 15,01$	19,77	$\pm 1,90$	15,25	$\pm 1,34$ ^{aA}
E+Cu+Nox	189,72	$\pm 3,06$	400,05	$\pm 13,90$	19,10	$\pm 1,90$	13,40	$\pm 1,34$ ^{aA}
Co+Hpx	191,60	$\pm 3,06$	393,03	$\pm 13,90$	19,22	$\pm 1,90$	16,78	$\pm 1,34$ ^{aA}
E+Hpx	185,26	$\pm 3,06$	432,16	$\pm 13,90$	22,93	$\pm 1,90$	18,44	$\pm 1,13$ ^{aA}
E+Cu+Hpx	190,31	$\pm 3,31$	399,67	$\pm 13,90$	20,82	$\pm 2,08$	21,20	$\pm 1,34$ ^{aB}
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
Dieta	ns		ns		ns		ns	
OD	ns		Nox < Hpx		ns		Nox < Hpx	
Dieta X OD	ns		ns		ns		0,016	

Tabela 11. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationala peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) nas brânquias de matrinxã ($n = 6 - 8$) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Brânquias							
	HP (nmol/mg de tecido)		SOD (USOD/ mg pt)		GSH-Px (nmol/mg pt)		CAT (UB/mg pt)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	145,49	$\pm 7,94$	619,76	$\pm 18,96$	20,61	$\pm 1,40$	2,49	$\pm 0,18$
E+Nox	136,84	$\pm 7,94$	533,14	$\pm 18,96$	20,50	$\pm 1,69$	2,15	$\pm 0,23$
E+Cu+Nox	153,93	$\pm 7,35$	577,81	$\pm 22,44$	22,26	$\pm 1,93$	3,32	$\pm 0,65$
Co+Hpx	144,54	$\pm 7,35$	538,92	$\pm 20,48$	24,51	$\pm 3,12$	2,65	$\pm 0,27$
E+Hpx	132,80	$\pm 7,94$	504,58	$\pm 18,96$	21,87	$\pm 2,43$	3,53	$\pm 0,43$
E+Cu+Hpx	121,99	$\pm 7,94$	459,23	$\pm 18,96$	19,07	$\pm 1,56$	3,03	$\pm 0,26$
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	ns		Co > E = E+Cu		ns		ns	
<i>OD</i>	ns		Nox > Hpx		ns		ns	
<i>Dieta X OD</i>	ns		ns		ns		ns	

Tabela 12. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) no coração de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Coração							
	HP (nmol/mg de tecido)		SOD (USOD/ mg pt)		GSH-Px (nmol/mg pt)		CAT (UB/mg pt)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	123,43	$\pm 7,22$ ^{aA}	307,97	$\pm 33,38$ ^{aA}	32,12	$\pm 1,66$ ^{aA}	3,38	$\pm 0,44$ ^{aA}
E+Nox	120,07	$\pm 6,59$ ^{aA}	322,00	$\pm 30,47$ ^{aA}	23,67	$\pm 1,81$ ^{bA}	2,55	$\pm 0,37$ ^{aA}
E+Cu+Nox	109,42	$\pm 6,11$ ^{aA}	426,63	$\pm 26,39$ ^{bA}	35,02	$\pm 1,66$ ^{aA}	3,39	$\pm 0,44$ ^{aA}
Co+Hpx	126,32	$\pm 7,22$ ^{aA}	340,78	$\pm 33,38$ ^{aA}	30,14	$\pm 1,66$ ^{aA}	2,99	$\pm 0,40$ ^{aA}
E+Hpx	88,40	$\pm 7,22$ ^{bB}	514,78	$\pm 30,47$ ^{bB}	29,96	$\pm 1,66$ ^{aB}	3,36	$\pm 0,35$ ^{aA}
E+Cu+Hpx	107,39	$\pm 6,11$ ^{abA}	429,30	$\pm 30,47$ ^{abA}	32,39	$\pm 1,66$ ^{aA}	5,45	$\pm 0,44$ ^{bB}
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	Co > E		Co < E = E+Cu		Co = E+Cu > E		Co = E < E+Cu	
<i>OD</i>	ns		Nox < Hpx		ns		Nox < Hpx	
<i>Dieta X OD</i>	0,038		0,008		0,025		0,029	

Tabela 13. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e concentração de hidroperóxidos (HP) no músculo vermelho de matrinxã (n = 6 – 8) (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias em normóxia (Nox) e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24h. Os resultados estão apresentados como valores médios \pm EPM. Letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferença entre as dietas em uma mesma concentração de OD e letras maiúsculas indicam diferença entre as concentrações de OD na mesma dieta ($p < 0,05$). (ns) não significativo.

Tratamentos	Músculo Vermelho							
	HP (nmol/mg de tecido)		SOD (USOD/ mg pt)		GSH-Px (nmol/mg pt)		CAT (UB/mg pt)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	114,85	$\pm 3,03$ ^{aA}	1090,25	$\pm 56,01$ ^{aA}	28,12	$\pm 2,25$ ^{aA}	12,83	$\pm 0,68$ ^{aA}
E+Nox	112,89	$\pm 3,27$ ^{aA}	965,70	$\pm 60,49$ ^{aA}	27,36	$\pm 2,46$ ^{aA}	10,72	$\pm 0,68$ ^{aA}
E+Cu+Nox	107,79	$\pm 3,58$ ^{aA}	867,28	$\pm 60,49$ ^{bA}	21,13	$\pm 2,46$ ^{aA}	8,89	$\pm 0,63$ ^{bA}
Co+Hpx	117,61	$\pm 3,27$ ^{aA}	771,58	$\pm 60,49$ ^{aB}	26,18	$\pm 2,25$ ^{abA}	10,11	$\pm 0,68$ ^{aB}
E+Hpx	101,16	$\pm 3,27$ ^{bB}	957,19	$\pm 60,49$ ^{aA}	21,84	$\pm 2,25$ ^{aA}	7,56	$\pm 0,68$ ^{bB}
E+Cu+Hpx	112,31	$\pm 3,03$ ^{aA}	1048,52	$\pm 60,49$ ^{bB}	35,58	$\pm 2,75$ ^{bB}	11,84	$\pm 0,68$ ^{aB}
ANOVA Dois Fatores ($p < 0,05$)								
<i>Dieta</i>	Co > E		ns		ns		Co > E	
<i>OD</i>	ns		ns		ns		ns	
<i>Dieta X OD</i>	0,036		<0,001		0,003		<0,001	

Tabela 14. Valores médios (\pm EPM) de atividade da enzima catalase (CAT), concentração das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GSH-Px) e de hidroperóxidos (HP) no músculo branco de matrinxã (*Brycon cephalus*) alimentado com dieta controle (Co) e suplementada com vitamina E (E) e vitamina E + cobre (E+Cu) durante 30 dias e posterior exposição a hipóxia (Co+Hpx, E+Hpx e E+Cu+Hpx) durante 24hs. Valores médios acompanhados de letras iguais ou ausente de letra não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Sempre que houver interação entre os fatores dieta e OD: Letras minúsculas comparam as dietas dentro de um mesmo nível de OD; e Letras maiúsculas comparam os níveis de OD dentro de uma mesma dieta.

Tratamentos	Músculo Branco							
	HP (nmol/mg de tecido)		SOD (USOD/ mg pt)		GSH-Px (nmol/mg pt)		CAT (UB/mg pt)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Co+Nox	151,68	\pm 3,79	1386,26	\pm 143,88 ^{aA}	109,89	\pm 11,84 ^{aA}	2,28	\pm 0,32 ^{abA}
E+Nox	144,76	\pm 4,09	1918,46	\pm 121,60 ^{bA}	167,78	\pm 11,84 ^{aA}	3,30	\pm 0,27 ^{aA}
E+Cu+Nox	145,56	\pm 4,09	1085,33	\pm 143,88 ^{aA}	100,12	\pm 11,84 ^{bA}	1,88	\pm 0,32 ^{bA}
Co+Hpx	154,12	\pm 4,09	1334,29	\pm 121,60 ^{aA}	134,65	\pm 11,84 ^{abA}	3,30	\pm 0,29 ^{aB}
E+Hpx	140,32	\pm 4,09	1124,29	\pm 143,88 ^{aB}	97,75	\pm 10,81 ^{aB}	2,19	\pm 0,29 ^{bB}
E+Cu+Hpx	141,59	\pm 4,09	1414,92	\pm 121,60 ^{aA}	131,71	\pm 13,24 ^{bB}	2,09	\pm 0,29 ^{bA}
ANOVA Dois Fatores								
<i>Dieta</i>	Co > E		ns		ns		Co = E > E+Cu	
<i>OD</i>	ns		ns		ns		ns	
<i>Dieta X OD</i>	ns		<0,001		<0,001		0,004	

5. Discussão

5.1. Parâmetros hematológicos

As variáveis hematológicas são utilizadas como indicadoras de saúde e estado nutricional dos animais, diversos fatores podem então alterar esses parâmetros, como patologias, infecções, intoxicação, levando a situações como, por exemplo, anemia, desencadeada por uma dieta pobre em nutrientes como ferro. As alterações hematológicas são causadas também em resposta a diversos estressores, dentre eles a hipóxia (JENSEN *et al.*, 1993; ROCHE & BOGÉ, 1999; MARCON & WILHELM FILHO, 1999; VAL, 2000; MONTERO *et al.*, 2001; AFFONSO *et al.*, 2002; WELLS, 2005; CARVALHO & FERNANDES, 2006).

As vitaminas e os minerais são essenciais para o funcionamento adequado do organismo e a dieta suplementada com vitamina E e vitamina E + cobre tem sido considerada necessária para a manutenção da função e estrutura dos eritrócitos. O cobre auxilia no processo de absorção do ferro pelo trato gastro-intestinal e também no seu transporte para dentro da célula, sendo um elemento importante no processo de formação da hemoglobina e função do eritrócito (CLEARWATER *et al.*, 2000). A absorção do íon ferro é dependente da redução do FeIII a FeII por duas redutases, esse ferro reduzido (FeII) liga-se a uma proteína transportadora e é re-oxidado por uma oxidase ancorada à membrana que possui íons cobre em sua estrutura e assim é transportado para dentro da célula. Outro mecanismo de absorção do ferro não-dependente de oxidases também envolve o íon cobre, porém esse mecanismo ainda não está totalmente elucidado (WINZERLING & LAW, 1997). Dessa forma o cobre auxiliaria no metabolismo do ferro como já evidenciado por HART (1927), que mostrou a eficácia do cobre no tratamento de anemia em mamíferos e foi observado que a

suplementação da dieta somente com o ferro não é tão eficiente quanto a associação de cobre e ferro (OSAKI *et al.*, 1966) no tratamento da anemia e no restabelecimento dos níveis de hemoglobina (WADDELL *et al.*, 1927). Pode-se então sugerir que o aumento na concentração de hemoglobina do sangue dos animais alimentados com dieta suplementada com vitamina E e cobre observado no presente estudo pode ter sido gerado pelo aumento na eficiência de absorção do ferro associado à função antioxidante da vitamina E e do cobre.

O aumento no Hct e a tendência de aumento dos demais parâmetros hematológicos em matrinxã alimentado com dieta suplementada em E+Nox e o aumento da [Hb] e CHCM em matrinxã alimentado com dieta suplementada com vitamina E + cobre+Nox sugerem possível aumento na função dos eritrócitos em relação ao transporte de O₂ e a presença de células vermelhas mais velhas.

Os valores de Hct e [Hb] de matrinxã são semelhantes aos de outras espécies que vivem em águas hipóxicas, o que permite a esses animais manter a atividade normal até certa concentração de OD (WELLS *et al.*, 2005). O aumento no RBC, Hct e [Hb] é uma resposta comum dos peixes frente a hipóxia atuando na melhora da captação de O₂ da água nas brânquias e sua transferência para os tecidos. No entanto, algumas espécies apresentam redução e outras não apresentam aumento desses parâmetros. Tambaqui, por exemplo, exposto a hipóxia durante 24h não aumentou [Hb] e RBC (AFFONSO *et al.*, 2002) como relatado em outras espécies expostas a hipóxia moderada (PERSON-LE RUYET *et al.*, 2003). O aumento no RBC, em animais submetidos a hipóxia, como em matrinxã em E e E+Cu, é uma resposta que ocorre em situações de hipóxia severa e aguda, quando a necessidade de aumento na capacidade de transporte de O₂ é maior (JOBLING, 1994). O aumento no número de eritrócitos pode ocorrer de duas formas diferentes: em hipóxia aguda, via liberação de eritrócitos presentes no baço; ou em

hipóxia prolongada (semanas) via eritropoiese. Em ambos os casos podem ser liberados na circulação, eritrócitos imaturos, os quais possuem menor concentração de Hb (WEBER & JENSEN, 1988; JENSEN *et al.*, 1993).

Estudos anteriores (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1993; MUUSZE *et al.*, 1998), com tambaqui e acará-açú, peixes amazônicos como o matrinxã, mostraram que em hipóxia severa ($OD < 1,0 \text{ mg O}_2/\text{L}$) esses animais apresentaram ativação de metabolismo anaeróbico, no entanto, em hipóxia menos severa, semelhante à utilizada no presente estudo (tensão crítica para a espécie, BOIJINK comunicação pessoal), houve supressão metabólica via redução da atividade natatória e, dessa forma, da demanda de O_2 . No presente estudo, o matrinxã necessitou de poucos ajustes hematológicos no grupo Co+Hpx, para manter o aporte de O_2 aos tecidos, provavelmente devido a sua menor atividade durante o período de hipóxia e também pelo fato do nível de OD utilizado não ser tão severo, como indica o nível aproximadamente constante de lactato plasmático (itens 4.3.1 e 4.3.2). O aumento no Hct em Co+Hpx sem aumento nos outros parâmetros hematológicos pode sugerir que houve deslocamento da água presente no sangue, gerando assim maior concentração destas células em hipóxia.

A ausência de alteração no VCM, tanto nas diferentes concentrações de OD quanto nas dietas, sugere que a concentração de OD, durante a hipóxia, não foi muito drástica aos animais. Alguns estudos (PERRY *et al.*, 1989; RANDALL & PERRY, 1992; VAL, 1993) mostram que em hipóxia aguda há liberação de catecolaminas, as quais se ligam a receptores de membrana dos eritrócitos e ativam transporte de Na^+/H^+ . O Na^+ e Cl^- entram na célula, resultando na entrada de água via osmose e aumento no volume celular (VCM), o que não ocorreu em matrinxã. O aumento no volume celular, devido a entrada de água na célula pode reduzir a concentração de ATP e GTP e de Hb e interferir na afinidade do O_2 pela hemoglobina (JENSEN *et al.*, 1998) melhorando o

transporte de O₂ (VAL, 1995; VAL & ALMEIDA-VAL, 1995; VAL, 1996). Esse mecanismo não ocorreu em matrinxã, uma vez que não houve aumento do VCM, provavelmente pelo fato da concentração crítica de O₂ para espécie ter sido alcançada gradualmente, o que permitiria a esses animais uma adaptação gradual.

Em geral, a queda no Hct e [Hb] pode indicar anemia, no entanto muitos autores atribuem à vitamina E capacidade antioxidante e manutenção da estrutura da membrana celular, via interação com fosfolípidios e redução da permeabilidade de membranas ricas em PUFA, como em eritrócitos de peixes (MINO & SUGITA 1978; HE & LAWRENCE, 1993). Em E+Hpx, apesar da redução em Hct e [Hb], houve aumento do CHCM, que pode ter favorecido uma maior capacidade de transporte de O₂ no sangue. RANDALL *et al.* (1992) e MCKENZIE *et al.* (1995) mostraram que a dieta rica em vitamina E, associada a hipóxia moderada, reduz a demanda energética e o consumo de O₂ em *Ancipenser naccarii*.

Portanto, os ajustes fisiológicos dos peixes, principalmente os amazônicos, em resposta a redução na concentração de O₂ na água (RANDALL, 1982; NILSSON & LUTZ, 1993; VIRANI & REES, 2000; AFFONSO *et al.*, 2002; COOPER *et al.*, 2002; AFFONSO & RANTIN, 2005; CHIPARI-GOMES *et al.*, 2005) têm mantido a quantidade de oxigênio necessária aos tecidos sem que ocorra necessidade de ajustes hematológicos muito acentuados. O aumento do Hct, no grupo alimentado com dieta controle, provavelmente é uma resposta comum ao estresse, mesmo que moderado (RANDALL & PERRY, 1992). A dieta suplementada com vitamina E e cobre provavelmente favoreceu a capacidade do animal em captar e transportar o oxigênio aos tecidos.

5.2. Efeitos Metabólicos

A dieta tem importância fundamental para a manutenção de funções vitais dos peixes e para o crescimento, locomoção e reprodução, (JOBBLING, 1994; WEBER & ZWINGESLSTEIN, 1995). Fatores como a atividade natatória e concentração de nutrientes podem alterar a demanda energética do animal (JOBBLING, 1994) alterando a capacidade de tolerância a hipóxia. A concentração crítica de oxigênio é a concentração de oxigênio em que o animal não é capaz de suprir a demanda de O₂ necessária para seu metabolismo e, abaixo dessa concentração de O₂, passa a utilizar o metabolismo anaeróbico para a demanda energética.

Sob condições de oxigênio limitado, a glicose e o glicogênio hepático são essenciais para a manutenção do desempenho dos animais, sendo utilizados de forma aeróbica ou anaeróbica, inclusive em órgãos essenciais para os ajustes frente a hipóxia (HAMAN *et al.*, 1997; DRIEDZIC & BAILEY, 1999). Apesar das proteínas representarem uma importante fonte energética para os teleósteos (WEBER & ZWINGESLSTEIN, 1995).

A dieta suplementada com vitamina E e cobre pode ter alterado o metabolismo de matrinxã, pois a maioria dos metabólitos avaliados (glicose, piruvato, amônia, glicogênio e proteína) apresentou diferenças significativas nesse grupo. No entanto, a concentração de lactato foi mantida constante indicando ausência de ativação do metabolismo anaeróbico. As alterações observadas em função da dieta administrada, como aumento de piruvato e amônia no fígado, de glicose, piruvato e amônia no músculo vermelho e amônia no músculo branco, sugerem que as dietas suplementadas induziram uma modificação no padrão metabólico desses animais. Provavelmente, em alguns órgãos, o glicogênio foi utilizado como fonte energética junto com a proteína,

pois foi observada redução na concentração dos mesmos no fígado. O aumento nas concentrações de piruvato indica uma maior utilização do metabolismo aeróbico.

O cobre, quando administrado em concentrações elevadas, pode gerar intoxicação, alterando o metabolismo celular para os processos de desintoxicação que requerem energia (CARVALHO, 2003). Trabalhos mostram que há acúmulo de cobre em concentrações superiores às utilizadas no presente estudo, sugerindo que a concentração de cobre utilizada nas dietas suplementadas não foi tóxica ao matrinxã e à maioria das outras espécies estudadas, como o salmão do Atlântico, *Salmo salar*, e *Sebastes schlegeli* (BERNTSSEN *et al.*, 1999a; 1999b; WATANABE *et al.*, 1997; KIM & KANG, 2004). A suplementação da dieta não aumentou a concentração de HP ou reduziu os estoques energéticos dos grupos E+Cu+Nox e E+Cu+Hpx, sugerindo que, no presente estudo, os efeitos no metabolismo de matrinxã não foram gerados por intoxicação, mas por uma possível melhoria da capacidade aeróbica desses animais, evidenciada pelo aumento do piruvato, em relação ao lactato, que apresentou níveis geralmente constantes. Esse aumento no metabolismo aeróbico pode ter ocorrido devido a maior capacidade de carrear o O₂ propiciado pelas maiores concentrações de Hb e maior número de eritrócitos nesses grupos.

Alguns estudos mostram que a vitamina E associada ao cobre pode induzir danos oxidativos *in vitro* (CHOW 1991, 2001; PROUDFOOT *et al.*, 1997). No entanto, esse mesmo efeito não foi observado *in vivo* em outros trabalhos (CAVA *et al.*, 2000; LAURIDSEN *et al.*, 2000) e no presente estudo em que a dieta E+Cu provavelmente não gerou maior peroxidação das membranas (item 5.3).

Em peixes o acúmulo de cobre ocorre principalmente no fígado (GROSELL *et al.*, 1997, 1998; KAMUNDE *et al.*, 2002; BIELMYER *et al.*, 2005), o que corrobora

com o encontrado na dieta E+Cu, no presente estudo, no qual a maioria das alterações foi observada no fígado.

Ao contrário das dietas, que mostraram diferenças nos intermediários metabólicos analisados, a hipóxia parece não ter causado muitas alterações metabólicas. Apenas a amônia aumentou em resposta a hipóxia nos tecidos analisados, indicando uma possível mobilização de aminoácidos para a síntese de glicose e glicogênio em outros tecidos, em condições de O₂ reduzido.

PERSON-LE RUYET *et al.* (2003) observaram aumento na concentração de lactato dos animais expostos a hipóxia, no entanto, peixes de água temperada parecem ser menos tolerantes a hipóxia. Em matrinxã, os níveis reduzidos de lactato no plasma indicam uma possível depressão metabólica quando em hipóxia moderada como já foi observado em outros estudos (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1993; MUUSZE *et al.*, 1998).

O hipometabolismo ou depressão metabólica ocorre em peixes tolerantes a hipóxia como o peixe-dourado e a carpa cruciana, diminuindo ou impedindo alterações no equilíbrio ácido-base e na taxa de redução das reservas como o glicogênio (JACKSON, 2004). Estudos com tambaqui (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1993), mostraram que esses animais começam a utilizar o metabolismo anaeróbico quando a redução do metabolismo não é mais suficiente, ou quando a concentração de O₂ na água alcança níveis muito reduzidos (hipóxia severa) que as enzimas oxidativas são inibidas e a LDH ativada, gerando assim maior produção de lactato e, conseqüentemente, acúmulo. O contrário foi observado em matrinxã, mostrando que a concentração de OD utilizada no presente estudo não foi muito severa para a espécie.

A razão lactato/piruvato ($R = [\text{lactato}] / [\text{piruvato}]$) é utilizada para verificar se a energia está sendo mobilizada de forma anaeróbica mesmo que não haja alteração nos níveis de lactato, pois quando há aumento no lactato e redução no piruvato essa razão

umenta indicando que os peixes estão em anaerobiose (JOBILING, 1994; SOUZA, 1999). A redução dessa razão no fígado (Co = 58,69; E = 47,93; E+Cu = 48,34; Co+Hpx = 54,00; E+Hpx = 45,90 e E+Cu+Hpx = 45,41) e músculo vermelho (Co = 191,77; E = 132,23; E+Cu = 133,70; Co+Hpx = 187,77; E+Hpx = 124,59 e E+Cu+Hpx = 90,00) dos grupos alimentados com dieta suplementada e também nos expostos a hipóxia sugerem maior requerimento do metabolismo aeróbico nesses tecidos. A redução nessa razão nos grupos Hpx do músculo vermelho, mais evidente no grupo E+Cu+Hpx, indica que esses animais não estavam em anaerobiose.

Apesar das diferenças mais evidentes terem sido observadas nos grupos alimentados com dieta suplementada com vitamina E + cobre, como a redução da razão lactato/piruvato no músculo vermelho e branco em E+Cu+Hpx ($R(E+Cu+Hpx) = 283,07$ e $R(E+Cu) = 342,25$) e o aumento da glicose no fígado e no músculo vermelho em E+Cu+Nox, foram também observadas diferenças no grupo E+Hpx. Provavelmente, em E+Hpx houve a manutenção do metabolismo aeróbico mesmo em hipóxia, pois, com exceção do músculo branco, todos os tecidos analisados apresentaram a razão lactato/piruvato menor que em Co+Hpx e/ou E+Nox (no plasma $R(Co) = 17,55$; $R(Co+Hpx) = 15,52$; $R(E) = 26,10$ e $R(E+Hpx) = 5,47$), sugerindo que ambas as dietas enriquecidas forneceram aos animais maior capacidade de manter o metabolismo aeróbico. O aumento do lactato e a queda do piruvato do músculo branco em E+Hpx sugerem maior utilização do metabolismo anaeróbico como observado por HOCHACHKA (1980) em tecidos periféricos de animais expostos a hipóxia, entretanto o mesmo não foi observado no músculo vermelho de matrinxã talvez porque este tecido normalmente utilize muito pouco o metabolismo anaeróbico, por ser um tecido oxidativo. Os níveis elevados de lactato no músculo branco, em relação ao vermelho,

podem refletir sua atividade glicolítica e, portanto, maior atividade da LDH (HOCHACHAKA, 1980; HOCHACHKA & SOMERO, 1984).

Em quase todos os tecidos foi observado uma tendência ao aumento na concentração de amônia nos grupos submetidos a hipóxia frente aos mantidos em normóxia e principalmente naqueles alimentados com dieta enriquecida com vitamina E e cobre, mostrando um possível aumento na utilização de aminoácidos como fonte energética desse grupo E+Cu+Nox e/ou E+Cu+Hpx (WALSH & HENRY, 1991; MORAES *et al.*, 1996, 2002). Os teleósteos, em geral, apresentam grande capacidade de converter aminoácidos em glicose (WEBER & ZWINGESLSTEIN, 1995). Aminoácidos provenientes das proteínas poderiam ser convertidos em glicose para utilização no metabolismo aeróbico durante os períodos em que a glicose é preferencialmente utilizada como em hipóxia (MOON & FOSTER, 1995).

MORAES *et al.* (2002) sugeriram que a concentração elevada de amônia acompanha os níveis de aminoácidos livres em *Gymnotus carapo*, expostos a hipóxia, indicando nova síntese de glicose, pois, assim como em matrinxã, o aumento de amônia também foi acompanhado por aumentos no piruvato e glicose. Apesar do presente estudo não ter determinado a concentração de aminoácidos é possível que as proteínas também sejam utilizadas como fonte de energia para síntese de glicogênio nos músculos. O aumento na concentração de amônia no músculo branco, apesar da ausência de evidências de quebra de proteínas, possivelmente ocorreu porque, quando em concentrações elevadas no plasma, a amônia tende a se acumular no músculo branco, como ocorreu em matrinxã expostos a hipóxia em todas as dietas, mas principalmente nas dietas suplementadas (WILKIE, 1997).

O glicogênio é a primeira fonte de carbono utilizada durante períodos de hipóxia severa em animais tolerantes a hipóxia, como o *Carassius auratus*, e é mobilizado como

glicose sanguínea (HOCHACHKA, 1980; HOCHACHKA & SOMERO, 1984). A queda de glicogênio no fígado dos animais expostos a hipóxia e alimentados com dieta suplementada e o aumento da concentração de glicose no plasma em E+Cu mostraram que houve uma mobilização dessa fonte energética quando os animais foram expostos a hipóxia (MORAES *et al.*, 2002) e que as dietas enriquecidas aumentaram a capacidade aeróbica via utilização do glicogênio hepático, provavelmente quebrado em glicose. Como os músculos, durante a hipóxia, estavam com metabolismo reduzido (menor atividade natatória observada nesses animais) a glicose que chegou ao tecido pode ter sido convertida novamente em glicogênio gerando aumento em sua concentração nesse órgão, principalmente no grupo E+Cu. Nesse mesmo grupo o lactato aumentado no músculo vermelho pode ter sido liberado para o plasma até chegar ao fígado, onde provavelmente foi convertido novamente em glicose, e contribuído para o aumento no glicogênio no músculo vermelho como já observado em outras espécies (MOON & FOSTER, 1995).

5.3. Efeitos nos parâmetros de estresse oxidativo

O presente estudo evidenciou que as defesas antioxidantes nos diferentes tecidos e órgãos apresentam grande variabilidade e respondem diferentemente frente a hipóxia ambiental em animais com dieta suplementada com vitamina E e cobre. A geração de ERO é dependente do consumo de O_2 e da quantidade de mitocôndrias presentes em cada tecido, sendo estas consideradas como o maior sítio de formação de ERO (SIES, 1986; STOREY, 1996; LENAZ, 1998; WILHELM FILHO *et al.*, 2000). Assim é esperado que órgãos com capacidade aeróbica mais elevada estejam mais sujeitos aos efeitos nocivos dos ERO e que suas DA também sejam mais altas. Como foi observado no presente estudo, em que a atividade da SOD apresentou-se elevada no plasma, talvez pela atividade da SOD extracelular (FRIDOVICH, 1998; MCCORD, 2000) e também devido à grande importância do plasma como transportador de moléculas essenciais para os tecidos. Além de o “status” antioxidante do plasma poder refletir os hábitos alimentares dos animais (BERRY & KOHEN, 1999).

No presente estudo, as diferenças observadas principalmente na atividade da SOD corroboram trabalhos anteriores que mostram a SOD como a primeira enzima a combater os ERO, via retirada do radical superóxido (O_2^{\bullet}) e formar um radical menos danoso (H_2O_2). A GSH-Px, que é dependente da concentração de GSH, não foi alterada em função do tecido analisado, apenas o músculo branco apresentou atividade maior que os outros tecidos. Provavelmente as concentrações de GSH foram mantidas constantes, pois estudos mostram que a redução na concentração de GSH contribui para toxicidade de alguns metais (MARACINE & SEGNER, 1998; SIES, 1999; CONNERS & RINGWOD, 2000), o que não foi observado no presente estudo. A CAT aumentou sua atividade apenas no fígado e no músculo vermelho, dois órgãos de grande importância tanto nos processos de desintoxicação quanto na geração de ERO devido à

presença de mitocôndrias em grande concentração. Nesses dois tecidos o aumento na atividade da CAT acompanhou a elevação da atividade da SOD, que provavelmente gerou mais H_2O_2 , sendo assim, necessário a retirada do peróxido a fim de evitar a formação de hidroperóxidos (SANCHEZ *et al.*, 2005).

WILHELM FILHO (1996) observou diferenças na atividade de enzimas antioxidantes em diversas espécies de peixes e sugeriu que, em teleósteos Amazônicos, como o matrinxã, o status antioxidante é determinado pelas características do ambiente aquático. Espécies amazônicas, que enfrentam mudanças sazonais na disponibilidade de O_2 e alimentação, possuem DA em níveis mais elevados que de outras espécies como a carpa (WDZIECZAK *et al.*, 1982) e peixes de água temperadas e polares (SPEERS-ROESCH & BALLANTYNE, 2005). Outro mecanismo de defesa de alguns peixes, dentre eles alguns amazônicos, são as altas concentrações de vitamina E no fígado em relação aos mamíferos, o que sugere maior proteção dos peixes contra peroxidação (HUANG *et al.*, 2003; RAU *et al.*, 2004).

Considerando que o metabolismo oxidativo depende da utilização de O_2 e que a geração de ERO está diretamente relacionada ao consumo de O_2 e sua disponibilidade no ambiente (WILHELM FILHO *et al.*, 1993, 2000, 2001; ROSS *et al.*, 2001, ABELE & PUNTARULO, 2004; ASHA DEVI *et al.*, 2005), a redução de O_2 ambiental poderia contribuir para a redução da formação de ERO. Entretanto, a hipóxia causa estresse fisiológico, danos celulares e ainda pode inibir os mecanismos de reparo celular (JONES, 1985). Peixes expostos a hipóxia aumentam a ventilação branquial para manter a cascata de O_2 até os tecidos (RANDALL, 1982; AFFONSO & RANTIN, 2005), diminuem a atividade locomotora (GRAHAM *et al.*, 1978; NILSSON & LUTZ, 1993) e podem reduzir a taxa metabólica ou aumentar a participação do metabolismo anaeróbico no metabolismo total (VIRANI & REES, 2000; AFFONSO *et al.*, 2002;

COOPER *et al.*, 2002; CHIPARI-GOMES *et al.*, 2005), o que não foi observado no presente estudo, pois em hipóxia não houve aumento na razão lactato/piruvato, que indicaria aumento do metabolismo anaeróbico. Estes processos de ajustes comportamentais e metabólicos podem contribuir para aumentar a produção de ERO apesar da redução do metabolismo aeróbico (WILHELM FILHO *et al.*, 1996; CHANDEL *et al.*, 1998; CHANDEL & SCHUMACKER, 2000). No presente estudo, a hipóxia não aumentou a geração de HP, somente no plasma, e não alterou a atividade enzimática na maioria dos tecidos, sugerindo que o matrinxã tem mecanismos para lidar com a geração de ERO na concentração crítica de O₂ para a espécie.

Em hipóxia os peixes podem utilizar o metabolismo anaeróbico que pode ser detectado pelo aumento na concentração de lactato no plasma e fígado dos animais expostos a hipóxia ou da razão lactato/piruvato (JOBBLING, 1994; SOUZA, 1999; AFFONSO *et al.*, 2002; CHIPARI-GOMES *et al.*, 2005). Entretanto, os dados apresentados no item 4.3 não mostraram aumento na concentração de lactato no plasma e fígado de matrinxã, tendo ocorrido inclusive redução na razão lactato/piruvato dos animais alimentados com dieta suplementada, sugerindo aumento na capacidade aeróbica mesmo em hipóxia, o que também possivelmente geraria mais ERO e conseqüentemente mais HP.

Os níveis de HP formados são utilizados para determinar se houve danos gerados aos lipídios e às membranas celulares devido a maior geração de ERO (JIANG *et al.*, 1991). Em hipóxia alguns animais podem sofrer aumento na concentração de TBARs (malonaldeído), que, assim como HP, também é um produto de oxidação de membranas, nos tecidos e sangue (HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002; RAMOS-VASCONCELOS & HERMES-LIMA, 2003; LUSCHCHACK *et al.*, 2005). No entanto, no presente estudo houve maior geração de HP somente no plasma em

hipóxia, independente da dieta fornecida, refletindo os ajustes hematológicos que os animais utilizam para compensar a hipóxia, que podem ter alterado a susceptibilidade dos lipídios livres do plasma a oxidação. Contudo, a concentração de HP no plasma em todos os tratamentos foi menor que nos outros tecidos, indicando que nesse tecido a concentração de HP pode ter refletido apenas a oxidação de lipídios presentes na circulação. Os outros tecidos analisados não apresentaram alterações nos níveis de HP em hipóxia, independentemente da dieta fornecida, enquanto no músculo vermelho e no coração houve interação entre os dois fatores (dieta e OD) indicando que a hipóxia só alterou os níveis de HP quando associada à dieta rica em vitamina E.

Os níveis de HP, formados no músculo vermelho e coração, foram menores no grupo E+Hpx em relação ao Co+Hpx, sugerindo o possível papel da vitamina E de impedir a produção de HP, assim como observado em outros estudos (CAVA *et al.*, 2000; LAURIDSEN *et al.*, 2000), e da hipóxia, ao induzir queda na concentração de HP no grupo E+Hpx em relação ao grupo E. A vitamina E é importante, pois parece ter protegido tecidos ricos em mitocôndrias e de grande importância nos ajustes fisiológicos, como o coração, frente a hipóxia. A vitamina E impede a geração de danos em corações de ratos submetidos a hipóxia e reperfusão (O'FARRELL *et al.*, 1997) reduzindo a inibição da atividade da SOD durante a hipóxia (CHEN *et al.*, 2002). No presente estudo houve aumento na atividade da SOD em E+Hpx, sugerindo um possível papel da vitamina E na promoção da atividade dessas enzimas antioxidantes alterando a concentração de ERO, como o superóxido metabolizado pela SOD (CHOW *et al.*, 1999).

Assim como nos dados do metabolismo (item 5.2), os parâmetros de estresse oxidativo, analisados no presente estudo, apresentaram maiores alterações em função da dieta fornecida do que dos níveis de OD, mostrando mais uma vez, que na concentração

crítica de oxigênio, concentração na qual as alterações na quantidade de ERO gerado começariam a ocorrer, o matrinxã manteve a captação e aporte de O₂ sem maior geração de ERO (sem aumento de HP) ou de lactato (item 5.2).

A ausência de aumento na concentração de HP e de alteração nas DA no fígado, órgão importante no processo de desintoxicação do organismo, com exceção do aumento da atividade da CAT e SOD nos grupos expostos a hipóxia (independentemente da dieta fornecida), sugere que os ajustes fisiológicos frente a hipóxia ambiental não causaram aumento na produção de ERO em matrinxã. A manutenção da atividade da SOD sugere também que a concentração de cobre utilizada na ração suplementada não foi excessiva, pois essa enzima parece ser a primeira a responder em casos de intoxicação e estresse oxidativo (MCCORD, 2000; BARATA *et al.*, 2005; SANCHEZ *et al.*, 2005). Espécies oxi-reguladoras, como o matrinxã (BOIJINK, comunicação pessoal), mantêm o consumo de O₂ relativamente constante até a concentração crítica de O₂ com o aumento da frequência e amplitude do movimento opercular, ou seja, maior atividade dos músculos ventilatórios (HOCHACHKA, 1980; AFFONSO & RANTIN, 2005) e alterando também [Hb], RBC e Hct o que mantém a cascata de O₂ até os tecidos.

Nas brânquias, primeiro órgão em contato com a água hipóxica, somente a SOD apresentou redução indicando menor geração de ERO em OD reduzido. A SOD também diminuiu nos animais alimentados com dieta rica em vitamina E e vitamina E + cobre, o que indica menor dano oxidativo sendo gerado devido a possível proteção fornecida pelas duas dietas. DANDAPAT *et al.* (2000) observou redução na atividade da SOD e a manutenção dos níveis basais da GSH-Px das brânquias, de animais alimentados com dieta suplementada com vitamina E, assim como observado em matrinxã, indicando proteção das membranas.

Assim como em outros tecidos, no coração, independentemente da concentração de OD, a dieta parece ter contribuído para o aumento na concentração da SOD e GSH-Px dos grupos alimentados com dieta rica em vitamina E e cobre. O coração tem papel importante durante a possível re-oxigenação dos tecidos e conseqüente aumento da atividade animal pós-hipóxia, durante a qual poderia ocorrer um grande aumento na produção de ERO devido a maior atividade cardíaca, e assim a maior atividade dessas enzimas antioxidantes preveniria contra esses danos (STOREY, 1996; WILHELM FILHO *et al.*, 2005). O coração é um tecido rico em mitocôndrias e com alta atividade aeróbica, sendo esperada elevada produção de ERO via cadeia transportadora de elétrons (responsável pela produção de ATP). Sua grande importância nos ajustes fisiológicos frente a hipóxia, como a redução da frequência cardíaca e o aumento do volume de sangue bombeado (RANDALL, 1982) torna necessária a manutenção de sua oxigenação. Além dos antioxidantes enzimáticos, o aumento de antioxidantes não-enzimáticos, não avaliados no presente estudo, como a glutatona (PANNUNZIO & STOREY, 1998), também é observado em animais que enfrentam hipóxia freqüentemente, corroborando com a hipótese de prevenção contra danos gerados durante o possível processo de re-oxigenação.

No músculo vermelho a alteração, gerada nos dois níveis de OD, é evidente somente quando associado a diferentes dietas, pois nessa concentração de OD a atividade do animal está reduzida e como o músculo vermelho é oxidativo e principal responsável pela atividade natatória do animal (HOCHACHKA & SOMERO, 1984; MILLIGAN, 1996; DAVISON, 1997) a redução na atividade da SOD e na atividade da CAT sem aumento do HP sugere um desvio da atividade metabólica dos músculos associados à natação para aqueles envolvidos na ventilação branquial ocorrendo uma redução geral na atividade do matrinxã submetido a hipóxia. O aumento de atividade

das enzimas (SOD, GSH-Px e CAT) no músculo vermelho do grupo E+Cu+Hpx pode indicar maior utilização do metabolismo aeróbico, sugerido pela redução na razão lactato/piruvato (item 5.2), o que possivelmente geraria mais ERO e conseqüentemente aumentaria as DA desses animais.

O aumento na CAT e GSH-Px do músculo vermelho do grupo E+Cu+Hpx em relação E+Hpx, sugere também, que a combinação E+Cu parece não ter sido tão eficiente em impedir o estresse oxidativo quanto somente a vitamina E nesse tecido, dessa forma foi necessário aumentar a atividade da CAT e GSH-Px para impedir a formação de HP. Talvez porque a vitamina E tenha sido requerida para reduzir os possíveis danos que o cobre estava gerando, assim como observado por BAKER *et al.* (1998). Parece que as concentrações de cobre utilizadas no presente estudo não foram prejudiciais, pois alguns trabalhos mostram que essas concentrações de cobre podem manter ou induzir maior crescimento de animais, indicativo de melhor balanço entre pró e antioxidantes, não gera maior acúmulo de cobre nos tecidos e não reduz os estoques energéticos de *Salmo salar* e *Sebastes schelegeli* (BERNTSSEN *et al.*, 1999a, 1999b; LEE & SHIAU, 2002; KIM & KANG, 2004).

A atividade das enzimas antioxidantes está intimamente ligada, por exemplo, quando há maior atividade da SOD a CAT e a GSH-Px também sofrem aumento em suas atividades (FRIDOVICH, 1998; SANCHEZ *et al.*, 2005). No presente estudo, foi observado no músculo vermelho do grupo E+Cu+Nox, que a redução na atividade da SOD gerou redução na GSH-Px e mesma tendência na CAT e no grupo E+Cu+Hpx que o aumento na atividade da SOD foi acompanhado de aumento da GSH-Px e mesma tendência da CAT. Assim sendo sugere-se que as concentrações de GSH não se alteraram, pois foi possível o aumento da atividade da GSH-Px (dependente da concentração de GSH).

A vitamina E administrada ao animal junto com o cobre pode potencializar o efeito pró-oxidante do cobre sob algumas condições *in vitro* (COMINACINI *et al.*, 1991; CHOW, 1991; BOWRY & STOCKER, 1993; PROUDFOOT *et al.*, 1997; CHOW, 2001). No presente estudo as concentrações de cobre (44 mg de Cu/kg ração) e vitamina E (281 mg vit E/kg ração) não promoveram aumento de peroxidação de membranas. O item 5.2 do presente estudo sugere uma tendência de aumento no metabolismo aeróbico dos animais alimentados com dieta rica em vitamina E e cobre, o que provavelmente geraria mais ERO desencadeando um aumento na atividade das enzimas antioxidantes como a CAT e GSH-Px no músculo vermelho, contudo a suplementação da dieta parece ter impedido a formação de HP, que não aumentaram nos tecidos avaliados.

A suplementação da ração com vitamina E reduziu os níveis de HP com poucos aumentos nas DA no músculo vermelho e cardíaco dos animais submetidos a hipóxia o que pode indicar maior proteção das membranas celulares gerada pela vitamina E como enfatizado por CHAIYAPECHARA *et al.* (2003) e melhor “status” antioxidante como também observado no hepatopâncreas de *Macrobrachium rosenbregii* (DANDAPAT *et al.*, 2000). CHOW *et al.* (1999) observou a menor geração de ERO (dentre eles o H₂O₂) em camundongos alimentados com dieta suplementada com vitamina E, o que pode ter ocorrido também em como indica a tendência de queda na atividade da GSH-Px e da CAT.

A menor atividade da SOD no músculo branco dos animais do grupo E+Hpx também sugere menor formação de radicais superóxido (O₂•), formados em concentrações possivelmente menores, devido a depressão metabólica ou redução da atividade natatória de alguns peixes quando em hipóxia (VIRANI & REES, 2000; COOPER *et al.*, 2002), ou pelo aumento do metabolismo anaeróbico sugerido no item

5.2. Como no presente estudo, os animais provavelmente não estavam em estresse oxidativo, pois não houve aumento nos níveis de HP e a atividade da GSH-Px e da CAT não aumentaram.

No presente estudo, o matrinxã apresentou respostas eficientes como queda na concentração de HP e manutenção da atividade de algumas enzimas durante a hipóxia, que podem ter sido fornecidas pelos níveis elevados de vitamina E no fígado nesta espécie (WILHELM FILHO, 1996). A dieta suplementada com vitamina E provavelmente gerou maior acúmulo da vitamina (KAEWSRITHONG *et al.*, 2001; MOURENTE *et al.*, 2002; RUFF *et al.*, 2002; TOCHER *et al.*, 2002; PAUL *et al.*, 2004) fornecendo maior tolerância a hipóxia mesmo com o metabolismo aeróbico mantido na maioria dos tecidos. A dieta suplementada com vitamina e Cobre não gerou maior concentração de HP, pois o aumento na atividade enzimática foi capaz de conter o possível aumento na geração de ERO causado pelo maior metabolismo aeróbico.

6. Conclusões

- a. As alterações hematológicas e ajustes fisiológicos de matrinxã frente a hipóxia ambiental cuja concentração de OD é igual a concentração crítica para a espécie foram suficientes para suprir as necessidades de O₂ da espécie;
- b. A dieta suplementada com vitamina E e cobre parece ter fornecido maior eficiência na formação de eritrócitos e hemoglobina de matrinxã;
- c. A dieta suplementada com vitamina E provavelmente gerou aos eritrócitos maior capacidade de resistir à oxidação, que mais maduros apresentam maior concentração de hemoglobina, permitindo maior CHCM;
- d. As dietas suplementadas provavelmente forneceram aos animais maior capacidade aeróbica, pois gerou queda na razão lactato/piruvato e aumento no piruvato e amônia;
- e. A hipóxia provavelmente não gerou aumento de ERO, pois não alterou a maioria dos parâmetros analisados, somente quando em associação com as dietas suplementadas;
- f. As dietas suplementadas foram eficientes ao prevenir o estresse oxidativo, que poderia ser gerado pelos ajustes metabólicos frente à hipóxia, pois a vitamina E diminuiu os níveis de HP no coração e músculo vermelho dos animais quando em hipóxia e a dieta vitamina E + cobre não aumentou os níveis de HP mesmo com o provável aumento no metabolismo aeróbico que essa dieta proporcionou;
- g. A dieta rica em vitamina E pareceu ser mais eficiente do que a rica em vitamina E + cobre, pois além de reduzir níveis de HP, não foi necessário o aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

7. Referências

ABELE, D., PUNTARULO, S. (2004) Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, 138 C, 405-415.

AEBI, H. (1974). Catalase. *In: Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, U.H. (Ed.), vol. 2, 2nd edition, New York: Academic Pres, 637-684.

AFFONSO, E.G. & RANTIN, F.T. (2005) Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. **Comp. Biochem. Physiol.**, 141C, 275-280.

AFFONSO, E.G.; POLEZ, V.L.P.; CÔRREA, C.F.; MAZON, A.F.; ARAÚJO, M.R.R.; MORAES, G.; RANTIN, F.T. (2002) Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, 133C, 375-382.

ALBERS, C. Acid-Base Balance in fish (1970) *In: Fish Physiology*. Hoar, W.S. and Randall, D.J. (Eds.), , vol. 4, Academic Press, Orlando, pp. 173-207.

ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; HOCHACHKA, P.W. (1993) Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an under-explored “goldmine”. *In: Surviving Hypoxia: Mechanisms of control and adaptation*. Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Van den Thillart, G. (eds.), CRC Press, Boca Raton, 435-445.

ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; WALKER, I. (1999) Long-term and short-term adaptation to varying oxygen levels: intra-specific phenotypic plasticity and

interspecific variation. *In: Biology of Tropical Fishes*, Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F. (eds.) INPA, Manaus, AM, 185-206.

ALMEIDA-VAL, V.M.F.; FARIAS, I.P.; SILVA, M.N.P.; DUNCAN, W.P.; VAL, A.L. (1995) Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 28, 1257-1263.

ALMEIDA-VAL, V.M.F.; SILVA, M.N.P.; CARACIOLO, M.C.M.; MESQUITA, L.S.B.; FARIAS, I.P.; VAL, A.L. (1992). LDH enzymes in Amazon fish – III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalminidae (Teleostei: Ostariophysi). **Comp. Biochem. Physiol.**, 103B, 119-125.

ASHA DEVI, S.; SUBRAMANYAM, M.V.V.; VANI, R.; JEEVARATNAM, K. (2005) Adaptations of the antioxidant system in erythrocytes of trained adult rats: Impact of intermittent hypobaric-hypoxia at two altitudes. **Comp. Biochem. Physiol.**, 140C, 59-67.

ASKNES, A. & NJAA, L.R. (1981) Catalase, glutathione peroxidase e superoxide dismutase in different fish species. **Comp. Biochem. Physiol.**, 69B, 893-896.

BAI, S.C. & GATLIN, D.M.III. (1983). Dietary vitamin E concentration and duration of feeding affect tissue α -tocopherol concentrations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquacult.**, 113, 129-135.

BAI, S.C. & LEE, K-J. (1998). Different levels of dietary DL- α -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquacult.**, 161, 405-414.

BAKER, R.T.M. & DAVIES, S.J., (1996) Changes in tissue α -tocopherol status and degree of lipid peroxidation with varying α -tocopherol acetate inclusion in diets for the African catfish. **Aquacult. Nutr.**, 2, 71-79.

BAKER, R.T.M. & DAVIES, S.J., (1997) The quantitative requirement for α -tocopherol by juvenile African catfish, *Clarias gariepinus*. Burchell. **Anim. Sci.**, 65, 135-142.

BAKER, R.T.M.; HANDY, R.D.; DAVIES, S.J.; SNOOK, J.C. (1998) Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the gray mullet, *Chelon labrosus*. **Mar. Environ. Res.**, 45, 357-365.

BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J.C.; ARUN, S.; PORTE, C. (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comp. Biochem. Physiol.**, 140C 175-186.

BELL, J.G. & COWEY, C.B., (1985) Vitamin E and selenium in fatty acid oxidation. *In: Nutrition and Feeding in Fish*. Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), Aberdeen, Scotland. Acad. Press, pp 333-347.

BERNTSSEN, M.H.G.; LUNDEBYE, A-K.; MAAGE, A. (1999a) Effects of elevated dietary copper concentrations on growth, feed utilization and nutritional status of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. **Aquacult.**, 174, 167-181.

BERNTSSEN, M.H.G.; HYLLAND, K., WENDELAAR BONGA, S.E.; MAAGE, A. (1999b) Toxic levels of dietary copper in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. **Aquat. Toxicol.**, 46, 87-99.

BERRY, E.M. & KOHEN, R. (1999) Is the biological system integrated and regulated? **Med. Hypoth.**, 53 (5), 397-401.

BIDINOTO, P.M.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G. (1997) Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Bol. Tec. Cepta**, 10, 53-60.

BIELMYER, G.K.; GATLIN, D.; ISELY, J.J.; TOMASSO, J.; KLAINÉ, S.J. (2005) Responses of hybrid striped bass to waterborne and dietary copper in freshwater and saltwater. **Comp. Biochem. Physiol.**, 140C, 131-137.

BLOOMER, L.C. & LEE, G.R. (1978) Normal hepatic copper metabolism. *In: Metals and the Liver*. Powell, L. W.(ed.), New York: Marcel Decker, p. 179-239.

BORBA, M.R.; FRACALOSSI, D.M.; PEZZATO, L.E.; MENOYO, D.; BAUTISTA, J.M. (2003). Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. **Aquat. Living Resour.**, 16, 362-369.

BOWRY, V. W. & STOCKER, R. (1993) Tocopherol-mediated peroxidation. The pro-oxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low density lipoprotein. **J. Am. Chem. Soc.**, 115, 6029–6044.

BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248-254.

BRAUM, E. & JUNK, W.J. (1982) Morphological adaptation of two Amazonian characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. **Int. Revue Res. Hydrobiol.**, 67, 869.

BRAUNER, C.J. & JENSEN, F.B. (1999) O₂ and CO₂ in fish: The non-linear release of Bohr/Haldane protons with oxygenation. *In: **Biology of Tropical Fishes***. Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), INPA, Manaus, AM, Brazil, pp. 393-400.

BUETTNER, G.R. (1993) The packing order of free radical and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, 300, 535-543.

CARVALHO, C.S. & FERNANDES, M.N. (2006) Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquacult.**, 251, 109-117.

CARVALHO, C.S. (2003) Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). São Carlos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 107p.

CAVA, R.; VENTANAS, J.; TEJEDA, J.F.; RUIZ, J.; ANTEQUERA, T. (2000) Effect of free-range rearing and α -tocopherol and copper supplementation on fatty acid profiles and susceptibility to lipid oxidation of fresh meat from Iberian pigs. **Food Chem.**, 68, 51-59.

CHABOT, D. & DUTIL, J-D. (1999) Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. **J. Fish Biol.**, 55, 472-491.

CHAIYAPECHARA, S.; CASTEN, M.T.; HARDY, R.W.; DONG, F.M. (2003) Fish performance, fillet characteristics, and health assessment index of rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing adequate and high concentrations of lipid and vitamin E. **Aquacult.**, 219, 715-738.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol.Rev.**, 59, 527-609.

CHANDEL, N.S. & SCHUMACKER, P.T. (2000) Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. **J. Appl. Physiol.**, 88, 1880–1889.

CHANDEL, N.S.; MALTEPE, E.; GOLDWASSER, E.; MATHIEU, C.E.; SIMON, M.C.; SCHUMACKER, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species tigers hypoxia-induced transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95, 11715-11720.

CHEN, H.; LI, D.; SALDEEN, T.; ROMEO, F.; MEHTA, J.L. (2002) Mixed tocopherol preparation is superior to α -tocopherol alone against hypoxia-reoxygenation injury. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, 291, 349-353.

CHIPARI-GOMES, A.R.; GOMES, L.C.; LOPES, N.P.; VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. (2005) Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, 141B, 347-355.

CHOW, C.K. (1991) Vitamin E and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, 11, 215-232.

CHOW, C.K. (2001) *In: Handbook of Vitamins*. Marcel Dekker, Rucker, R., Suttie, J.W., McCormick, D.B., Machlin, L.J. (Eds.), New York, pp. 165-196.

CHOW, C.K.; IBRAHIM, W; WEI, Z; CHAN, A. (1999) Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. **Free Rad. Biol.Med.**, 27, 580-587.

CLEARWATER, S.J.; BASKIN, S.J.; WOOD, C.M.; MCDONALD, D.G. (2000) Gastrointestinal uptake and distribution of copper in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 203, 2455-2466.

COMINACINI, L.; GARBIN, U.; CENCI, B.; DAVOLI, A.; PASINI, C.; RATTI, E.; GAVIRAGHI, G.; LOCASCIO, V.; PASTORINO, A. M. (1991) Predisposition to LDL oxidation during copper catalysed oxidative modification and its relation to α -tocopherol content in humans. *Clin. Chim. Acta*, 204, 57-68.

CONNERS, D.E. & RINGWOOD, A.H. (2000) Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquat. Toxicol.*, 50, 341-349.

COOPER, R.U.; CLOUGH, L.M.; FARWELL, M.A.; WEST, T.L. (2002) Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 279, 1– 20.

COWEY, C.B.; ADRON, J.W.; YOUNGSON, A. (1983) The vitamin requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquacult.*, 30, 85-93.

DANDAPAT, J.; CHAINY, G.B.N.; RAO, K.J. (2000) Dietary vitamin-E modulates antioxidant defense system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 127 C, 101-115.

DAVIES, K.J.A. (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *Life*, 50, 279-289.

DAVISON, W. (1997). The effects of exercise training of teleost fish, a review of recent literature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A, 67-75.

DETHLOFF, G.M. & BAIMAIER, K.L. (2001) Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Orchorynchus mykiss*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 40, 371-380.

DEVLIN, T.M. (1997) **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 4th ed. Edgard Blucher, São Paulo.

DRIEDZIC, W.R. & BAILEY, J.R. (1999) Anoxia cardiac tolerance in Amazonian and North temperate teleosts is related to the potential to utilize extracellular glucose. *In: Biology of Tropical Fishes*. Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F. (eds), INPA, Manaus, 217-227.

DRÖGE, W. (2002) Free radicals in the physiological control of the cell function. **Physiol. Rev.**, 82, 47-95.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28 (3), 350-356.

DUNN, J.F. & HOCHACHKA, P.W. (1986) Metabolic responses of trout (*Salmo gairdneri*) to acute environmental hypoxia. **J. Exp. Biol.**, 123, 229-242.

FERNANDES, M.N.; SANCHES, J.R.; MATSUZAKI, M.; PANEPUCCI, L.; RANTIN, F.T. (1999) Aquatic respiration in facultative air-breathing fish: Effects of temperature and hypoxia. *In: Biology of Tropical Fishes*. Val AL & Almeida e Val VMF (Editors), pp. 341-352. INPA, Manaus, AM, Brazil.

FITZGERALD, J.P. (1992) Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, 101B, 111-114.

FRASCÁ-SCORVO, C.M.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. (2001) Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. **Bol. Inst. Pesca**, 27, 1-5.

FRIDOVICH, I. (1998) Oxygen toxicity: A radical explanation. *J. Exp. Biol.*, 201, 1203-1209.

FRITSCHÉ, R. & NILSSON, S. (1993) Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. *In: Fish Ecophysiology*. Rankin, J.C & Jensen, F.B. (eds), Chapman. & Hall, London, 180-206.

GAETKE, L.M. & CHOW, C.K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicol.*, 189, 147-163.

GATLIN, D.M. & WILSON, R.P. (1986) Dietary copper requirements of fingerling channel catfish. **Aquacult.**, 54, 277-285.

GATLIN, D.M.III.; BAI, S.C.; ERICKSON, M.C. (1992) Effects of dietary vitamin E and synthetic antioxidants on composition and storage quality of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquacult.**, 106, 323-332.

GENTZKOW, C.J. & MANSEN, J.M. (1942) An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. Biol. Chem.*, 143, 531-544.

GINSBURG, I. (1998) Could synergistic interactions among reactive oxygen species, proteinases, membrane-perforating enzymes, hydrolases, microbial hemolysins and cytokines be the main cause of tissue damage in infectious and inflammatory conditions? **Med. Hypotheses**, 51, 337–346.

GINSBURG, I. & KOHEN, R. (1995) Synergistic effects among oxidants, membrane-damaging agents, fatty acids, proteinases, and xenobiotics: Killing of epithelial cells and release of arachidonic acid. **Inflammation**, 19, 101–118.

GRAEF, E.W.; RESENDE, E.K.; PETRY, P.; STORTI FILHO, A. (1987) Policultivo de matrinhã (*Brycon sp.*) e jaraqui (*Semaprochilodus sp.*) em pequenas represas. **Acta Amazônica**, único, 33-42.

GRAHAM, J.B; KRAMER, D.L.; PINEDA, E. (1978) Comparative respiration of an air-breathing and non-air-breathing characoid fish and the evolution of aerial respiration in characins. **Physiol. Zool.**, 51, 279-288.

GROSELL, M.; HOGSTRAND, C.; WOOD, C.M. (1997) Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, 38, 257-276.

GROSELL, M.; HOGSTRAND, C.; WOOD, C.M. (1998) Renal Cu and Na excretion and hepatic metabolism in both Cu acclimated and non acclimated rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, 40, 275-291.

GUIMARÃES, S.F. & STORTI FILHO, A. (1997) The effects of temperature on survival of young matrinhã (*Brycon cephalus*) under laboratory conditions. *In: Proceedings of the International Symposium Biology of Tropical Fishes*, Manaus, AM., p.41.

HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.G. (1974) Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **J. Nutr.**, 104, 580-587.

HAMAN, F.; ZWINGELTEIN, G.; WEBER, J-M. (1997) Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 273, 2046-2054.

HAN, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. (2001). Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into membrane space. **Biochem. J.**, 353, 411-416.

HARLIÖGLU, M.M. & BARIM, O. (2004) The effect of dietary vitamin E on the pleopodal egg and stage-1 juvenile numbers of freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). **Aquacult.**, 236, 267-276.

HARROWER, J.R. & BROWN, C.H. (1972) Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.**, 32 (5), 709-711.

HART, E.B; STEENBOCK, J.; WADDELL, J.; ELVEHJEM, C.A. (1928). Iron nutrition. VII. Copper is a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. **J. Biol. Chem.**, 77, 797-812.

HE, H. & LAWRENCE, A.L. (1993) Vitamin requirement of *Penaeus vannamei*. **Aquacult.**, 118, 245-255.

HERMES-LIMA, M. & ZENTENO-SAVÍN, T. (2002) Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comp. Biochem. Physiol.**, 133C, 537-556.

HOCHACHKA, P.W. (1980) **Living without Oxygen**. Harvard University Press, Cambridge, England, pp. 100-116.

HOCHACHKA, P.W. & SOMERO, G.N. (1984) **Biochemical Adaptation**. Princeton University Press, NJ, p. 85-144.

HUANG, C.H.; CHANG, R.J.; HUANG, S.L. CHEN; W. (2003) Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 134B, 265-270.

HUANG, C-H.; HIGGS, D.A.; BALFRY, S.K.; DEVLIN, R.H. (2004) Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 139A, .199-204.

JACKSON, D.C. (2004) Acid-base balance during hypoxic hypometabolism: selected vertebrate strategies. **Resp. Physiol. Neurobiol.**, 141, 273-283.

JENSEN, F.B.; FAGO, A.; WEBER, R.E. (1998) Hemoglobin structure and function. In: **Fish Physiology**. Perry, S.F.; Tufts, B.L. (eds.). Academic Press, San Diego, p. 1-40.

JENSEN, F.B.; NIKINMAA, M.; WEBER, R.E. (1993) Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In: **Fish Ecophysiology**. Rankin, J.C & Jensen, F.B. (eds), Chapman. & Hall, London, 161-179.

JIANG, Z-Y.; WOOLARD, A.C.S. E WOLFF; S.P. (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, 26, 853-856.

JOBLING, M. (1994) **Fish Bioenergetics**. Chapman & Hall, London, UK. 309 p.

JONES, D.P. (1985) The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. *In: Oxidative Stress*. Sies, H. (Ed), Academic Press, London, pp. 151-195.

JUNK, W.J.; SOARES, G.M.; CARVALHO, F.M. (1983). Distribution of fish species in a lake of the Amazon river floodplain near Manaus (lago Camaleão), with special reference to extreme hypoxia conditions. **Amazoniana**, 7, 397.

KAESRITHONG, J.; OHSHIMA¹, T.; USHIO, H.; NAGASAKA, R.; MAITA, M.; SAWADA, M. (2001) Effects of an excess dose of dietary α -tocopherol on hydroperoxide accumulation and erythrocyte osmotic fragility of sweet smelt *Plecoglossus altivelis* (Temminck et Schlegel). **Aquacult. Res.**, 32 (1), 191-198.

KAMUNDE, C.; GROSELL, M.; HIGGS, D.; WOOD, C.M. (2002) Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary copper exposure. **J.Exp. Biol.**, 205, 279-290.

KAPPUS, H. & SIES, H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. **Experimentia**, 37, 1223-1241.

KIM, S-G. & KANG, J-C. (2004) Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Mar. Envir. Res.**, 58, 65-82.

KLATT, P., LAMAS, S. (2002) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. **Eur. J. Biochem.**, 267, 4928-4944.

KOHEN, R. & NYSKA, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, 30, 620-650.

LAI, C.; HUANG, W.; KLEVAY, L.M.; GUNNING, W.T.; CHIU, T.H. (1996) Antioxidant enzyme gene transcription in copper-deficient rat liver. **Free Rad. Biol. Med.**, 21, 233-240.

LAURIDSEN, C.; JENSEN, S.K.; SKIBSTED, L.H.; BERTELSEN, G. (2000) Influence of supranutritional vitamin E and copper on α -tocopherol deposition and susceptibility to lipid oxidation of porcine membranous fractions of *M. Psoas major* and *M. Longissimus dorsi*. **Meat Sci.**, 54, 377-384.

LEE, M-H. & SHIAU, S-Y. (2002) Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. **Fish Shellfish Immunol.**, 13, 289-270.

LEHNINGER, A.L. (1975). **Biochemistry**. Worth, New York.

LENAZ, G. (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. **Biochim. Biophys. Acta**, 1366, 53-57.

LOVELL, R.T; MIYAZAKI, T.; RABEGNATOR, S. (1984) Requirements of α -tocopherol by channel catfish fed diets low in polyunsaturated triglycerides. **J. Nutr.**, 114, 894-901.

LU, G.D.(1939) 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.33, 249-254.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V.; LUSHCHAK, O.V.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B. (2005) Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. **Int.J. Biochem. Cell Biol.**, 37, 1319–1330.

LYGREN, B.; HAMRE, K.; WAAGBO, R. (2000) Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon *Salmo salar* L. Fed three different levels of dietary vitamin E. **Aquacult. Res.**, 31, 401-407.

MARACINE, M. & DEGNER, H. (1998) Citotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. **Comp. Biochem. Physiol.**, 120A, 83-88.

MARCON, J. L. & WILHEM FILHO, D. (1999). Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. **Comp. Biochem. Physiol.**, 123C, 257-263.

MARCON, J.L. (1996) Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa. Doctoral thesis, Manaus, Brazil.

MCCORD, J.M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. **A. J. Med.** 108, 652-659.

MCKENZIE, D.J.; PIRACCINI, G.; STEFFENSEN, J.F.; BOLIS, C.L.; BRONZI, P.; TAYLOR, E.W. (1995). Effects of diet on spontaneous locomotor activity and oxygen consumption in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). **Fish Physiol. Biochem.**, 14, 341-355.

MILLIGAN, C.L. (1996) Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. **Comp. Biochem. Physiol.**, 113A, 51-60.

MINO, M. & SUGITA, K. (1978) The membrane action of alpha-topherol upon oxidative damamge in erythrocytes. *In: Tocopherol, Oxygen and Biomembranes.* deDuve, C. & Hayaishi, O. (eds.). Elsevier, Amsterdam.

MONTERO, D.; TORT, L.; ROBAINA, L.; VERGANA, J.M.; IZQUIERDO, M.S. (2001) Low vitamin E in diet reduces resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Fish Shelfish Immun.**, 11, 473-790.

MOON, T.W. & FOSTER, G.D. (1995) Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Fihes.* Hochachka & Mommsen (eds.), Eselvier Science Publishers, Amsterdan, v.4, 65-100.

MOORE, J.W. & RAMAMOORTHY, S. (1984) **Heavy metals in naturals waters.** Springer, Berlin, p. 77-79.

MORAES, G.; OLIVEIRA, M.B.; RANTIN, F.T. (1996) The metabolic pattern change of *Hoplias malabaricus* from normoxia to hypoxia conditions. **Rev. Bras. Biol.**, 56(2), 191-196.

MORAES, G.; AVILEZ, I.M.; ALTRAN, A.E.; BARBOSA, C.C. (2002) Biochemical and hematological responses of the banked knife fish *Gymnotus carapo* (LINNEAUS, 1758) to environmental hypoxia. **Braz. J. Biol.**, 64(4A), 633-640.

MOURENTE, G.; DÍAZ-SALVAGO, E.; BELL, J.G; TOCHER, D.R. (2002) Increased activities of hepatic antioxidant defense enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus*

aurata L.) fed dietary oxidized oil: attenuation by dietary vitamin E. **Aquacult.**, 214, 343-361.

MURAI, T.; ANDREWS, J.W.; SMITH, R.G. JR. (1981) Effects of dietary copper on channel catfish. **Aquacult.**, 22, 353-357.

MUUSZE, B.; MARCON, J.; VAN DEN THILLART, G., ALMEIDA-VAL, V. (1998) Hypoxia tolerance of Amazon fish. Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 120A, 151-156.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC, (1993) **Nutrient requirements of fish**. National Academy Press, Washington, 114p.

NG, W-K.; WANG, Y.; KETCHIMENIN, P.; YUEN, K-H. (2004). Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquacult.**, 233, 423-437.

NIKINMAA, M. (1992). Membrane transport and control of hemoglobin-oxygen affinity in nucleated erythrocytes. **Physiol. Rev.**, 72, 301-321.

NILSSON, G.E. & LUTZ, P.L. (1993) Role of GABA in hypoxia tolerance, metabolic depression and hibernation-possible links to neurotransmitter evolution. **Comp. Biochem. Physiol.**, 105C, 329-336.

NOHL, H. & HEGNER, D. (1978) Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? **Eur. J. Biochem.**, 82, 563-567.

O'FARRELL, S. & JACSON, M.J. (1997) Dietary polyunsaturated fatty acids, vitamin E and hypoxia/reoxygenation-induced damage to cardiac tissue. **Clin. Chim. Acta**, 267, 197-211.

OSAKI, S.; JOHNSON, D.A.; FRIEDEN, E. (1966) The possible significance of ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. **J. Biol. Chem.**, 241, 2746-2751.

PAN, Y. & LOO, G. (2000) Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. **Free Rad. Biol. Med.**, 28, 824-830.

PANNUNZIO, T.M. & STOREY, K.B. (1998) Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 221, 277-292.

PAUL, B.N.; SARKAR, S.; MOHANTY, S.N., (2004) Dietary vitamin E requirement of mrigal, *Cirrhinus mrigala* fry. **Aquacult.**, 242, 529-536.

PAYNTER, D.I.; MOIR, R.J.; UNDERWOOD, E.J (1979) Changes in activity of Cu-Zn superoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with change in dietary copper. **J. Nutr.**, 109, 1570-1576.

PERRY, S.F; KINKEAD, R.; GALLAUGHER, P.; RANDALL, D.J. (1989) Evidence that hypoxemia promotes catecholamines release during hypercapnic acidosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Respir. Physiol.**, 77, 651-364.

PERSON-LE RUYET, J.; LACUT, A.; LE ABYON, N.; LE ROUX, A.; PICHAVANT, K.; QUÉMÉNER, L. (2003) Effects of repeated hypoxic shocks on growth and metabolism of turbot juveniles. **Aquat. Living Resour.**, 16, 25-34.

POSTON, H.A.; GERALD, F.; COMBS, J.R.; LEIBOVITZ, L. (1976) Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. **J. Nutr.**, 106, 892-904.

PRIOR, R.L. & CAO, G. (1999) In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.**, 27, 1173-1181.

PROUDFOOT, J.M.; CROFT, K.D.; PUDDEY, I.B.; BELLIN, L.J. (1997) The role of copper reduction by alpha-tocopherol in low-density lipoprotein oxidation. **Free Radic. Biol. Med.**, 23, 720-728.

RAMOS-VASCONCELOS, G.R. & HERMES-LIMA, M. (2003) Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. **J. Exp. Biol.**, 206, 675-685.

RAMOS, G.; ALVES, A.L.; HERMES-LIMA, M. (2000) Radicais livres, antioxidantes e adaptabilidade animal. *In: O que é vida: Para entender a biologia do século XXI*. El-Hani, C.N e Videira, A.A.P (Eds), pp. 209-231.

RANDALL, D.J. (1970). Gas exchange in fish. *In: Fish Physiology*. Hoar, W.S. and Randall, D.J. (Eds.), Academic Press, Orlando, pp. 253-292.

RANDALL, D. (1982) The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.**, 100, 275-288.

RANDALL, D.J. & PERRY, S.F. (1992) Catecholamines. *In: Fish Physiology*. Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Farrell, A.P. (eds.). Academic press, NY, p. 255-300.

RANDALL, D.J.; MCKENZIE, D.J.; ABRAMI, G.; BONDILOTTI, G.P.; NATIELLO, F.; BRONZI, P.; BOLIS, L.; AGRADI, E. (1992) Effects of diet on responses to hypoxia in sturgeon (*Acipenser naccarii*). **J. Exp. Biol.**, 170, 113-125.

RANTIN, F.T. & KALININ, A.L. (1996) Cardiorespiratory function and aquatic surface respiration in *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. *In: Physiology and Biochemistry of the Fish of the Amazon*. Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. & Randall, D.J. (eds.), INPA, AM, p.169-180.

RAU, M.A.; WHITAKER, J.; FREEDMAN, J.H.; DI GIULIO, R.T. (2004) Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. **Comp. Biochem. Physiol.**, 137C, 335-342.

REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. (1998) The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comp. Biochem. Physiol.**, 120C, 1-27.

REY, A.I. & LOPES-BOTE, C.J. (2001) Effect of dietary copper and vitamin E supplementation, and extensive feeding acorn and grass on longissimus muscle composition and susceptibility to oxidation in Iberian pigs. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, 85, 281-292.

RICHTER, C.; GOGVADZE, V.; LAFFRANCHI, R.; SCHLAPBACH, R.; SCHWEZER, M.; SUTER, M.; WALTER, P.; YAFFEE, M. (1995) Oxidants in mitochondria: From physiology to diseases. **Biochim. Bioph. Acta**, 1271, 67-74.

RITOLA, O.; LIVINGSTONE, D.R.; PETERS, L.D.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P. (2002) Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. **Aquacult.**, 210, 1-19.

ROCHE, H. & BOGÉ, G. (1996) Fish Blood Parameters as a Potential Tool for Identification of Stress Caused by Environmental Factors and Chemical Intoxication. **Mar. Environ. Res.**, 41, 27-43.

ROSS, S.W.; DALTON, D.A.; KRAMER, S.; CHRISTENSEN, B.L. (2001) Physiological (antioxidant) response of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. **Comp. Biochem. Physiol.**, 130C, 289-303.

RUFF, N.; FITZGERALD, R.D.; CROSS, T.F.; KERRY, J.P. (2002) Fillet shelf-life of Atlantic halibut *Hippoglossus hipoglossus* L. fed elevated levels of α -tocopheryl acetate. **Aquacult. Res.**, 33, 1059-1071.

SAKAI, T.; MURATA, H.; ENDO, M.; SHIMOMURA, T.; YAMAUCHI, K.; ITO, T.; YAMAGUCHI, T.; NAKAJIMA, H.; FUKUDOME, M. (1998) Severe oxidative stress is thought to be a principal cause of jaundice of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Aquacult.**, 160, 205-214.

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER, J-M.; AÏT-AÏSSA, S. (2005) Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Env. Toxicol. Pharmacol.**, 19, 177-183.

SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M.; AMES, B.N. (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91, 10771-10778.

SIES, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int.**, Ed., 25, 1058-1071.

SIES, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. **Free Rad. Biol. Med.**, 27, 916-921.

SOKOL, R.J.; MCKIM, J.M.; DEVEREAUX, M.W. (1996) Alpha-tocopherol ameliorates oxidant injury in isolated copper-overloaded rat hepatocytes. **Pediatr. Res.**, 39, 259-563.

SOUZA, R.H.S. (1999) Respostas cardio-respiratórias de dourado, *Salminus maxillosus* (VALENCIENNES, 1849) (TELEOSTEI, CHARACIDAE) submetido a hipóxia ambiental. São Carlos, Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos.133p.

SPEERS-ROESCH, B. & BALLANTYNE, J.S. (2005) Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of Arctic and temperate teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.**, 140A, 487-494.

SPITZ, D.R. & OBERLEY, L.W. (1989) An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Anal. Biochem.**, 179, 8-18.

STANGL, G.I.; NOSTELBACHER, K.; EDER, K.; KIRCHGESSNER, M. (2000) Chronic vitamin E inadequacy and thermally treated oils affect the synthesis of hepatic metallothionein isoforms. **Eur. J. Nutr.**, 39, 112-120.

STÉPHAN, G.; GUILLAUME, J.; LAMOUR, F. (1995) Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: Effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. **Aquacult.**, 130, 251-268.

STORELLI, C.; ACIERNO, R.; MAFFIA, M. (1998) Membrane lipid and protein adaptations in Antarctic fish. *In: Cold Ocean Physiology*. Pfrtner, H.O., Playle, R. (Eds.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 166– 189.

STOREY, K.B., (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 29, 1715-1733.

SUKALSKI, K.A.; LABERGE, T.P.; JOHNSON, W.T. (1997) In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. **Free Rad. Biol. Med.**, 22, 835-842.

SUNDIN, L. (1999) Hypoxia and blood flow control in fish gills. *In: Biology of Tropical Fishes*. Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds), INPA, Manaus, AM, Brazil, pp. 353-362.

TAYLOR, C.G.; BETTGER, W.J.; BRAY, T.M. (1988) Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. **J. Nutr.**, 118, 613-621.

TOCHER, D.R.; MOURENTE, G.; VAN DER EECKEN, A.; EVJEMO, J.O.; DIAZ, E.; BELL, J. G.; GEURDEN, I.; LAVENS, P.; OLSEN, Y. (2002) Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquacult. Nutr.**, 8, 195-207.

TORRES; P., TORT; L. FLOS, R. (1987) Acute toxicity of copper to mediterranean dofsh. **Comp. Biochem. Physiol.**, 86, 169-177.

VAL, A.L. (1993) Adaptations of fish to extreme conditions in fresh waters. *In: The Vertebrate Gas Transport Cascade. Adaptations to Environment and Mode of Life.* Bicudo, J.E.P.W. (ed.). CRC Press, Boca Raton, 43-53.

VAL, A.L. (1995) Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments, **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 28, 1119-1127.

VAL, A.L. (1996) Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. *In: Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon.* Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. (eds), INPA, AM, 59-73.

VAL, A.L. (2000) Organic phosphates in the red blood cells of fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, 125A, 417-435.

VAL, A.L. & ALMEIDA-VAL, V.M.F. (1995) **Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and biochemical features**, Springer Verlag, Heidelberg.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; AFFONSO, E.G. (1990) Adaptive features of Amazon fishes: Hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). **Comp. Biochem. Physiol.**, 97, 435-440.

VAN RAAIJ, M.T.M.; PIT, D.S.S.; BALM, P.H.M.; STEFFENS, A.B.; VAN DEN THILLART, G.E.E.J.M. (1996) Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. **Horm. Behav.**, 30, 85-92.

VIRANI, N.A. & REES, B.B. (2000) Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. **Comp.Biochem.Physiol.**, 126A, 397–405.

WAAGBØ, R.; HAMRE, K.; BJERKÅ, E.; BERGE, R.; WATHNE, E.; WATHNE, Ø. L.; TORSTENSEN, B. (2003) Cataract formation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolt relative to dietary pro- and antioxidants and lipid level. **J. Fish Dis.**, 26, 213-229.

WADDELL, J.; STEENBOCK, H.; ELVEHJEM, C.A.; HART, E.B. (1927) Iron in nutrition V. Iron salts and iron-containing ash extracts in the correction of anemia. **J. Biol. Chem.**, 77, 777-795.

WALSH, P.J. & HENRY, R.P. (1991) Carbon dioxide and ammonia metabolism and exchange. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Hochachka, P.W. & Mommsen, T.P. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, v.1, 181-207.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. (1997) Trace minerals in fish nutrition. **Aquacult.**, 151, 185-207.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; MATSUI, M.; OGINO, C.; KAWABATA, T. (1981) The relationship between dietary lipid levels and α -tocopherol requirement of rainbow trout. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, v.47, p1463-1471.

WDZIECZAK, J.; ZALESNA, G.; WUJEC, E.; PÉRES, G. (1982) Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. **Comp. Biochem. Physiol.**, 73B (2), 361-365.

WEBER, J-M. & ZWINGESLSTEIN, G. (1995) Circulatory substrate fluxes and their regulation. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Hochachka, P.W. & Mommsen, T.P. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, v.4, 15-32.

WEBER, R.E & JENSEN, F.B. (1988) Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. **A. Rev.Physiol.**, 50, 161-179.

WEBER, R.E. (1996) Hemoglobin adaptations in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity. *In: Physiology and Biochemistry of the Fish of the Amazon*. Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. & Randall, D.J. (eds.), INPA, AM, p.75-90.

WEBER, R.E.; LYKKEBOE, G.; JOHANSEN, K. (1975) Biochemical aspects of the adaptation of hemoglobin affinity of eels to hypoxia. **Life Sci.**, 17, 1345-1350.

WELLS, R.M.G.; BALDWIN, J.; SEYMOUR, R.S.; CHRISTIAN, K.; BRITAIN, T. (2005) Red blood cell function and hematology in two tropical freshwater fishes from Australia. **Comp. Biochem. Physiol.**, 141A, 87-93.

WESER, U.; SCHUBOFZ, L.M.; YOUNES, M. (1979). Chemistry of copper proteins and enzymes. *In: Copper in the Environment. II. Health Effects*, Nriagu, J. O. (ed.), New York: Willey, p. 197-232.

WILHELM FILHO, D. (1996) Fish antioxidant defenses – A comparative approach. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 29, 1735-1742.

WILHELM FILHO, D. & MARCON, J. L. (1996) Antioxidant defenses in fish of the Amazon. *In: Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*, Val *et al.* (Eds.), INPA, AM, p. 299-312.

WILHELM FILHO, D.; GIULIVI, C.; BOVERIS, A. (1993) Antioxidant defenses in marine fish. I—Teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.**, 106C, 409-413.

WILHELM FILHO, D.; BREDESTON, L.M.; BERMUDEZ, M.N.; BOVERIS, A. (1999) Hydrogen peroxide diffusion in fish gills. *In*: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds), **Biology of Tropical Fishes**, INPA, Manaus, AM, Brazil, pp. 241-251.

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

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; MARCON, J.L.; FRAGA, C.G.; BOVERIS, A. (2000). Comparative antioxidant defenses in vertebrates – emphasis on fish and mammals. **Trends Comp. Biochem. Physiol.**, 7, 33-45.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; TRIBESS, T.A.; PEDROSA, R.C.; SOARES, C.H.L. (2001) Influence of season and pollution on the antioxidant defenses in the cichlid fish acará (*Geophagus brasilienses*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34 (5), 719-726.

WILKIE, M.P. (1997) Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. **Comp. Biochem. Physiol.**, 118A, 39-50.

WINZERLING, J.J. & LAW, J.H. (1997) Comparative Nutrition of iron and copper. **Annu. Rev. Nutr.**, 17, 501-526.

WISE, D.J.; TOMASSO, J.R.; GATLIN, D.M.; BAI, S.C.; BLAZER, V.S. J. (1993) Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione

peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish.

Aquat. Anim. Health., 5, 177.

WOOTONM, R.J. (1990) **Ecology of Teleost Fishes**. Chapman and Hall, New York.