

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Vanessa Medeiros da Rosa

**EFEITO DA DIETA CONTENDO RUTINA SOBRE A INFLAMAÇÃO,
APOPTOSE E A RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*) INFECTADOS COM *Aeromonas hydrophila***

Santa Maria, RS
2019

Vanessa Medeiros da Rosa

**EFEITO DA DIETA CONTENDO RUTINA SOBRE A INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E
A RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) INFECTADOS
COM *Aeromonas hydrophila***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Amália Pavanato

Santa Maria, RS
2019

Rosa, Vanessa Medeiros da

Efeito da dieta contendo rutina sobre a inflamação, apoptose e a resposta antioxidante em jundiás (*Rhamdia quelen*) infectados com *Aeromonas hydrophila* / Vanessa Medeiros da Rosa.- 2019.

83 p.; 30 cm

Orientadora: Maria Amália Pavanato

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2019

1. Peixes 2. Bactérias 3. Produtos naturais I.
Pavanato, Maria Amália II. Título.

Vanessa Medeiros da Rosa

**EFEITO DA DIETA CONTENDO RUTINA SOBRE A INFLAMAÇÃO,
APOPTOSE E A RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)
INFECTADOS COM *Aeromonas hydrophila***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovado em 30 de maio de 2019:



Maria Amália Pavanato, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)


Maurício Laterça Martins, Dr. (UFSC) - Videoconferência


Maria Rosa Chitolina, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Senhor da minha história, por cuidar de mim, me sustentar e me dar forças em todos os momentos.

À professora Maria Amália, pela paciência, compreensão e por todos os ensinamentos.

À minha família, meus pais Maria de Lourdes e Olavo e meu irmão Vinícius, pelo amor, apoio incondicional, esforços sem medidas e compreensão.

Ao Lucas, pelo cuidado, por não me deixar desanimar, por estar sempre ao meu lado e à disposição para me ajudar.

Às minhas colegas Karine, Isabela, Juliana, Caroline, Elisia, Lauren e Micaila, pelo auxílio, companheirismo, amizade, aprendizado, conversas e risadas.

Aos membros do Lafipe, professores Bernardo Baldisserotto, Mauro Cunha e Carla Zeppenfeld por disponibilizarem os laboratórios para a realização dos experimentos e ao Guerino pelo auxílio na inoculação bacteriana.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Farmacologia, por contribuírem para minha formação e à Zeli por estar sempre disposta a resolver o que fosse preciso.

Ao BioRep pela parceria e por possibilitar a realização de uma parte importante deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

EFEITO DA DIETA CONTENDO RUTINA SOBRE A INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E A RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) INFECTADOS COM *Aeromonas hydrophila*

AUTORA: Vanessa Medeiros da Rosa

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Maria Amália Pavanato

As condições de cultivo na piscicultura submetem os peixes, incluindo o jundiá (*Rhamdia quelen*), a situações de estresse, tornando-os mais suscetíveis a doenças causadas por bactérias, tais como a *Aeromonas hydrophila*. A necessidade de melhorias no manejo e no bem-estar dos peixes é uma preocupação constante e tem levado à procura por produtos naturais. A adição de rutina na dieta pode ser uma alternativa para prevenir as doenças decorrentes do estresse inerente ao cultivo, uma vez que possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, entre outras. Assim, este trabalho objetivou avaliar o possível efeito protetor da dieta contendo rutina sobre o músculo de jundiás infectados com *A. hydrophila*. Para tanto, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: controle; rutina 0,15%; *A. hydrophila*; e rutina 0,15% + *A. hydrophila*. Após duas semanas de alimentação com as dietas experimentais, os peixes dos grupos *A. hydrophila* e rutina 0,15% + *A. hydrophila* foram infectados experimentalmente com *A. hydrophila* e os dos grupos 1 e 2 receberam veículo (salina 0,9%). Os animais infectados e não infectados foram alimentados com as dietas controle e contendo rutina por mais uma semana, totalizando 3 semanas experimentais. Depois deste período, os jundiás foram eutanasiados e o músculo foi coletado para a avaliação de marcadores de morte celular, inflamação e estresse oxidativo. A adição de rutina na dieta diminuiu a hemorragia, a infiltração inflamatória e a atividade da mieloperoxidase nos peixes infectados. Essa dieta também reduziu a apoptose induzida por *A. hydrophila*, ao diminuir a expressão de Akt fosforilada e de Bax nesses animais. Além disso, a adição de rutina na dieta reduziu os níveis de óxido nítrico e de ânion superóxido, bem como aumentou a atividade da superóxido dismutase, os quais estavam alterados nos jundiás infectados. Essa dieta não foi capaz de recuperar os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e cisteína, nem a expressão da subunidade catalítica da glutamato cisteína ligase nos jundiás, diminuídos em decorrência da infecção. Apesar disso, a adição de rutina na dieta elevou atividade da glutathiona redutase e os níveis de resíduos de cisteína em proteínas, bem como reduziu o conteúdo de dissulfetos mistos, que estavam modificados nos peixes infectados. Essa dieta também diminuiu os níveis de glutathiona oxidada (GSSG), diminuindo, assim, a razão GSSG/GSH, a qual estava aumentada nos animais infectados. Finalmente, a adição de rutina na dieta reduziu os níveis de lipoperoxidação, elevou os de ácido ascórbico e a capacidade antioxidante total, que estavam alterados nos peixes infectados. Portanto, a adição de rutina na dieta protege o músculo de jundiás frente à uma situação desafiadora, como é o caso da infecção por *A. hydrophila*.

Palavras-chave: Peixes. Bactérias. Produtos naturais. Morte celular. Infiltração inflamatória. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

EFFECT OF THE DIET CONTAINING RUTIN ON INFLAMMATION, APOPTOSIS AND ANTIOXIDANT RESPONSE IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) INFECTED WITH *Aeromonas hydrophila*

AUTHOR: Vanessa Medeiros da Rosa

ADVISOR: Prof.^a Dr.^a Maria Amália Pavanato

Fish culture conditions lead fish as silver catfish (*Rhamdia quelen*) to stressful situations, making them more susceptible to diseases caused by bacteria, including *Aeromonas hydrophila*. Thus, there is a real need to improve the fish handling and welfare, since it represents a constant concern to fish farming. In this context, natural products appear as interesting options to be studied. Rutin-added diet can be an alternative to prevent diseases related to the stress inherent to the culture conditions, since it has been described as having antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidative properties, among others. This work aimed to evaluate the possible protective effect of rutin-containing diet on muscle of silver catfish infected with *A. hydrophila*. For this, silver catfish were randomly divided into 4 groups: control; 0.15% rutin; *A. hydrophila*; and 0.15% rutin + *A. hydrophila*. After 2 weeks of feeding with the experimental diets, fish from groups *A. hydrophila* and 0.15% rutin + *A. hydrophila* were experimentally infected with *A. hydrophila* and those from groups 1 and 2 received vehicle (0.9% saline). The infected and uninfected animals were fed the control and rutin diets for a further week, totalizing 3 experimental weeks. After this period, silver catfish were euthanized, and the muscle was collected for the evaluation of markers of cell death, inflammation and oxidative stress. Rutin-added diet decreased the hemorrhage, inflammatory infiltration and myeloperoxidase activity in infected fish. This diet also reduced apoptosis induced by *A. hydrophila* through decreasing the expression of phosphorylated Akt and Bax in these animals. In addition, rutin-added diet reduced the levels of nitric oxide and superoxide anion as well as increased superoxide dismutase activity, which were altered in infected silver catfish. This diet was not able to recover neither the levels of reduced glutathione (GSH) and cysteine nor the expression of the catalytic subunit of glutamate cysteine ligase in silver catfish, decreased as a result of the infection. Despite this, rutin-added diet elevated the glutathione reductase activity and the levels of cysteine residues in proteins, as well as reduced the content of mixed disulfides, which were modified in infected fish. This diet also decreased the levels of oxidized glutathione (GSSG), thus reducing the GSSG to GSH ratio, which was increased in infected animals. Finally, rutin-added diet reduced levels of lipid peroxidation, increased ascorbic acid and total antioxidant capacity, which were altered in infected fish. Therefore, the addition of rutin in the diet protects the muscle of silver catfish in a challenging situation, as *A. hydrophila* infection.

Keywords: Fish. Bacteria. Natural products. Cell death. Inflammatory infiltration. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 –	Espécime de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	12
Figura 2 –	Redução parcial do oxigênio.....	14
Figura 3 –	Via intrínseca da apoptose.....	18
Figura 4 –	Remoção das EROs pelas enzimas antioxidantes.....	19
Figura 5 –	Síntese de GSH.....	21
Figura 6 –	Estrutura química básica dos flavonoides.....	26
Figura 7 –	Estrutura do flavonoide rutina.....	27

MANUSCRITO

Figure 1 –	Effects of rutin on inflammation in muscle of <i>A. hydrophila</i> infected-silver catfish.....	57
Figure 2 –	Figure 2 - Effects of rutin on apoptosis in muscle of <i>A. hydrophila</i> infected-silver catfish.....	58
Figure 3 –	Effects of rutin on apoptotic triggers in muscle of <i>A. hydrophila</i> infected-silver catfish.....	59
Figure 4 –	Effects of rutin on glutathione redox status and thiol-protein mixed disulfide in muscle of <i>A. hydrophila</i> infected-silver catfish.....	60
Figure 5 –	Effects of rutin on glutathione synthesis in muscle of <i>A. hydrophila</i> infected-silver catfish.....	61
Figure 6 –	Effects of rutin on lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidant responses in muscle of <i>A. hydrophila</i> infected-silver catfish.....	62

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 –	Formulation (%) of the experimental standard diet.....	64
Table 2 –	Effects of rutin on TAC index in muscle of <i>A. hydrophila</i> infected-silver catfish: its relationship with GSH and AA levels.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico (<i>ascorbic acid</i>)
Akt	Serina treonina quinase (<i>serine/threonine kinase</i>)
Apaf-1	Fator de ativação de apoptose 1 (<i>apoptotic peptidase activating 1</i>)
ATP	Adenosina trifosfato (<i>adenosine tri-phosphate</i>)
Bak	<i>Bcl-2 antagonistic killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X</i>
Bcl-2	Regulador de apoptose Bcl-2 (<i>Bcl-2 apoptosis regulator</i>)
BH3	<i>Bcl-2 homology 3</i>
CAT	Catalase (<i>catalase</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EO	Estresse oxidativo (<i>oxidative stress</i>)
ERN	Espécie reativa de nitrogênio (<i>reactive nitrogen specie</i>)
ERO	Espécie reativa de oxigênio (<i>reactive oxigen specie</i>)
GCL	Glutamato cisteína ligase (<i>glutamate cysteine ligase</i>)
GCLc	Subunidade catalítica da glutamato cisteína ligase (<i>glutamate-cysteine ligase catalytic subunit</i>)
GPx	Glutationa peroxidase (<i>glutathione peroxidase</i>)
GR	Glutationa reductase (<i>glutathione reductase</i>)
GSH	Glutationa reduzida (<i>reduced glutathione</i>)
GSSG	Glutationa oxidada (<i>oxidized glutathione</i>)
GST	Glutationa S-transferase (<i>glutathione-S-transferase</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio (<i>hydrogen peroxide</i>)
Ile	Isoleucina (<i>isoleucine</i>)
LPO	Lipoperoxidação (<i>lipid peroxidation</i>)
MAP-quinases	Proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen activated protein kinase</i>)
MDA	Malondialdeído (<i>malondialdehyde</i>)
MPO	Mieloperoxidase (<i>myeloperoxidase</i>)
NADPH	Adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced</i>)
NF-κB	Fator nuclear kappa B (<i>nuclear factor kappa B</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase (<i>nitric oxide synthase</i>)
¹ O ₂	Oxigênio singlete (<i>singlet oxygen</i>)
O ₂ ⁻	Ânion radical superóxido (<i>superoxide anion radical</i>)
OH [•]	Radical hidroxil (<i>hydroxyl radical</i>)
ONOO ⁻	Peroxinitrito (<i>peroxynitrite</i>)
OTC	Oxitetraciclina (<i>oxytetracycline</i>)
PSH	Resíduos de cisteína em proteínas (<i>cysteine residues of proteins</i>)
PSSX	Dissulfetos mistos (<i>mixed disulfides</i>)
SMAC	Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria (<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>)
SOD	Superóxido dismutase (<i>superoxide dismutase</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>tumoral necrosis factor alpha</i>)
XIAP	Inibidor da apoptose ligado ao X (<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>Rhamdia quelen</i>	12
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	14
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO	15
2.3.1 Apoptose e inflamação	17
2.3.2 Sistema de defesa antioxidante	19
2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS NA DIETA DE PEIXES.....	22
2.5 <i>Aeromonas hydrophila</i>	23
2.6 FLAVONOIDES.....	25
2.6.1 Flavonoide Rutina	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MANUSCRITO	31
5 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A - ESQUEMA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL	82
ANEXO B - NÍVEIS DE HEMORRAGIA	83

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura no Brasil tem crescido em importância econômica, por isso, para otimizar a produção e a rentabilidade, é necessária atenção a inúmeros fatores relacionados às condições de cultivo como manejo e condições ambientais, já que o bem-estar é refletido na habilidade do animal para lidar com estressores infecciosos e não-infecciosos, mantendo assim a homeostase e boa saúde. Enquanto que condições de criação estressantes e sofrimento prolongado levam à perda da capacidade de enfrentamento e, contribuindo para uma situação de estresse e por consequência, problemas de saúde (SEGNER et al., 2012; DENEV et al., 2009).

O jundiá (*Rhamdia quelen*), um peixe nativo da região sul, é uma das espécies mais comuns cultivadas nesta região, bem adaptada ao nosso ambiente, de fácil indução à desova e aceitação de alimento artificial, com grande potencial para piscicultura (EMBRAPA, 2017; BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004; RODRIGUES-GALDINO et al., 2009). Assim como outras espécies cultivadas, está sujeito a uma série de problemas como doenças oportunistas, alterações fisiológicas e imunológicas, ou seja, situações que geram estresse e podem comprometer a produção, além de serem condições difíceis de controlar (SANTOS et al., 2009).

Esses problemas podem levar ao estresse oxidativo (EO), que ocorre quando há um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, favorecendo a interrupção da sinalização redox e controle e/ou dano molecular (SIES, 2015). Nessa condição, a partir do metabolismo celular energético, são geradas em altas concentrações as espécies reativas de oxigênio (EROs), que são intermediários reativos formados na redução parcial do O₂ e podem ser radiculares ou não-radicalares (LUSHCHAK, 2014). Quando há EO, as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico (NO) também poderão ser produzidas em excesso, podendo levar ao estresse nitrosativo e a formação de outras espécies, como o peroxinitrito (ONOO⁻) (KOLIOS et al., 2004).

A produção excessiva de EROs/ERN pode desencadear danos às macromoléculas como proteínas, lipídios e DNA, que podem ser irreversíveis, resultando em morte celular por apoptose, com a indução da liberação de fatores pró-apoptóticos, que ativam as caspases, enzimas proteolíticas com papel central nesse processo. As EROs/ERN também podem agir como sinalizadoras e mediadoras do processo inflamatório, estimulando a ativação de fatores de transcrição celular (BERTOLETTO et al., 2012). Porém, os organismos aeróbicos, como os peixes, possuem estratégias celulares contra os processos mediados pelo excesso de EROs, que incluem defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (PAVANATO; LLESUY, 2008).

Neste contexto, doenças oportunistas como as causadas por bactérias são responsáveis por sérias infecções no cultivo intensivo, dentre os patógenos causadores, estão *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum* e *Edwardsiella tarda* que fazem parte da microbiota normal da água ou dos animais aquáticos (BALDISSEROTTO; RADÜNZNETO, 2004). A bactéria *A. hydrophila* é considerada o principal agente patogênico na aquicultura (AOKI, 1999) e tem sido comumente isolada de peixes e encontrada em tanques de cultivo. Está relacionada a síndromes hemorrágicas e graves lesões ulcerativas nos peixes, o que reduz a capacidade do sistema imunológico, leva ao atraso no crescimento, a alta taxa de mortalidade e a redução da produtividade (KREUTZ et al., 2010).

Tendo em vista as reações de estresse que podem ser geradas/desencadeadas nos animais cultivados e a crescente procura por alternativas naturais e mais saudáveis que melhorem a produção, e que sejam livres de resíduos de antibióticos e agroquímicos, substâncias provenientes de plantas têm sido utilizadas para melhorar o desempenho. Os flavonoides, como a rutina, que são metabólitos secundários dos vegetais poderiam ser utilizados como aditivos na dieta dos peixes, já que possuem propriedades antioxidantes, atuando como “scavengers” de radicais livres (LEE et al., 2013). A rutina é encontrada em frutas cítricas, cebola, trigo sarraceno e uva (HOLIMAN et al., 1996) e possui atividades anti-inflamatória (PAN et al., 2014), anticancerígena (WEBSTER et al., 1996), hepatoprotetora (KHAN et al., 2012), neuroprotetora (AZEVEDO et al., 2013), entre outras.

Sendo assim, este trabalho procurou avaliar a influência da adição da rutina 0,15% na dieta sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, parâmetros inflamatórios, apoptóticos e histológicos no músculo de jundiás desafiados com *A. hydrophila*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Rhamdia quelen*

O jundiá (espécie *Rhamdia quelen*, família Heptapteridae, ordem Siluriformes) é um peixe com distribuição neotropical, que se estende do centro da Argentina até o sul do México (SILFVERGRIP, 1996). É considerada uma espécie adequada para aquicultura, devido a características como fácil manejo, boa eficiência alimentar e rápido crescimento em clima temperado ou subtropical, o que o torna indicado para a produção em países da América do Sul, como o Brasil (ABREU et al., 2016; PEREIRA et al., 2006; MORÓN-ALCAIN et al., 2017). De acordo com a EMBRAPA (2017), o jundiá está entre as espécies mais cultivadas na região sul do Brasil.

Figura 1 – Espécime de Jundiá (*Rhamdia quelen*)



Fonte: Fish base, disponível em: <http://www.fishbase.org>.

A dieta do jundiá, é constituída principalmente por peixes, insetos, moluscos e crustáceos, já que possui hábito alimentar onívoro, com tendência piscívora (RINGUELET et al., 1967). Os jundiás são bentônicos, preferem águas calmas, escondem-se entre pedras e troncos e preferem os locais mais escuros (GUEDES, 1980; PIAIA, 1996). Com o corpo coberto de couro, sua coloração varia de marrom-avermelhado claro a cinza, o que depende do ambiente em que se encontra, quando colocados em ambientes claros, sua coloração tende a ficar mais clara e o inverso ocorre quando encontra-se em ambientes escuros. Possui uma variação albina, comercializada como peixe ornamental. Quanto ao crescimento, este aumenta de acordo com a elevação da temperatura e é mais acentuado nos primeiros anos de vida, nos machos a taxa de crescimento é maior até o terceiro ou quarto ano de vida, quando as fêmeas passam a crescer mais rápido, atingindo comprimento e pesos maiores do que os machos. A maturidade sexual é

atingida por volta de um ano de idade nos dois sexos e o período reprodutivo ocorre de agosto a fevereiro (CARVALHO GOMES et al., 2000; BALDISSEROTTO, 2009).

De acordo com o 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura (ACEB, 2014), o jundiá é uma das espécies de peixes nativas, com potencial para utilização na piscicultura, é bem adaptado às condições de cultivo em cativeiro, sua carne é saborosa, possui baixo teor de gordura e ausência de espinhos intramusculares, sendo bem aceito no mercado consumidor (LUCHINI; AVENDAÑO, 1985; CARNEIRO; MIKOS, 2005). Apesar disso, assim como ocorre com outras espécies, existem alguns desafios enfrentados na produção de jundiás, relativos ao estabelecimento de condições que forneçam bem-estar aos animais, como temperatura ideal e ao manejo que potencialmente pode induzir estresse nos peixes, como captura, transferência de tanques, procedimentos de contagem e pesagem e densidade de estocagem (BARCELLOS et al., 2004).

As condições estressantes às quais os peixes são submetidos, prejudicam a sua saúde, aumentam a suscetibilidade a doenças e assim, reduzem seu desempenho (SEGNER et al., 2012). Além disso, essas condições afetam o balanço dos pró-oxidantes/antioxidantes, o que gera a ocorrência do estresse oxidativo (MONSERRAT et al., 2007). O ambiente em que os peixes vivem influencia de forma importante a sua saúde e bem estar, já que eles encontram-se em contato íntimo com a água, dessa forma, é extremamente necessário manter o controle adequado das características químicas e físicas para um bom rendimento na criação (BALDISSEROTTO, 2009). Por isso, deve-se, através da associação de uma boa qualidade da água dos tanques de cultivo, manejo, densidade de estocagem e adequado teor nutricional da ração, buscar assegurar o bem-estar dos animais. Medidas profiláticas, como suplementação ou adição de compostos naturais na dieta vem sendo testadas, a fim de otimizar o desempenho, melhorar a imunidade, diminuir o estresse e aumentar a resistência a enfermidades dos peixes (SANTOS et al., 2009).

Em um estudo realizado por Awad et al. (2013), em que foram adicionadas três concentrações de extrato de urtiga (quercetina) e óleo de semente de cominho (*Nigella sativa*) à dieta de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), durante quatorze dias, observou-se nos grupos que receberam as doses mais altas de quercetina (1%) e óleo de *N. sativa* (3%) aumentos na lisozima, proteína total, atividades bactericida e de antiprotease.

Da mesma forma, em um estudo realizado com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a suplementação dietética com própolis e Aloe (*Aloe barbadensis*) por 15 dias, trouxe benefícios aos peixes, melhorando a imunidade, capacidade antioxidante e sobrevivência frente à bactéria *A. hydrophila* (DOTTA et al., 2018).

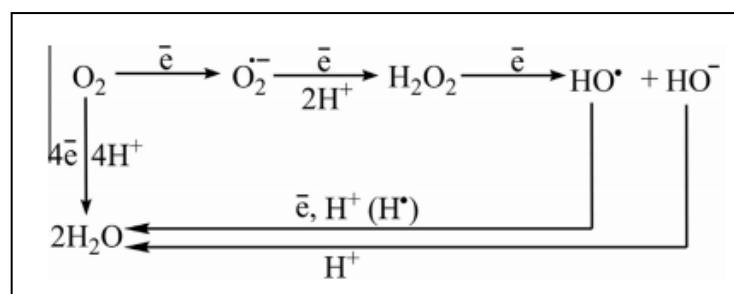
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

Nos organismos vivos, o oxigênio exerce papel fundamental para a geração de energia na forma de ATP, via cadeia transportadora de elétrons acoplada à fosforilação oxidativa. A maior parte do oxigênio consumido é reduzido diretamente a água, no entanto, cerca de 10% sofre reduções parciais, levando à produção das espécies reativas de oxigênio (LUSHCHAK, 2014).

As EROs são produzidas, tanto em animais saudáveis quanto em doentes, ou seja, são geradas como parte do metabolismo normal da célula e não são sempre tóxicas, podem atuar como moléculas sinalizadoras, mediando várias respostas biológicas, como expressão gênica, proliferação celular, imunidade inata, morte celular programada e senescência. A principal fonte *in vivo* dessas substâncias é a mitocôndria, mas outras fontes e processos endógenos incluindo certas enzimas e auto oxidação podem dar origem às EROs (WINTERBOURN, 2015; EVANS; HALLIWELL, 1999; FRANSEN et al., 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A conversão do oxigênio molecular em EROs (Figura 2), pode ocorrer através de uma série de reações redox gerando oxigênio singlete, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. Muitas dessas EROs são consideradas radicais livres, que são definidos como qualquer espécie capaz de existir de forma independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; DOWLING; SIMMONS, 2009).

Figura 2 – Redução parcial do oxigênio



Fonte: Adaptado de Lushchak (2014), p. 2.

O oxigênio singlete (¹O₂), é uma das formas mais reativas do O₂, geralmente gerado por reações de fotossensibilização. As ligações duplas, como em ácidos graxos poliinsaturados ou

guanina em bases de DNA são seus alvos preferenciais nas reações químicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; DIPLOCK et al., 1998).

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é um produto da redução do oxigênio molecular formado durante a respiração normal na mitocôndria, que pode também ser produzido pela ação de várias oxidases como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase, a xantina oxidase, a ciclooxigenase e pela autoxidação de certas biomoléculas, como catecolaminas e hemoglobina (EVANS; HALLIWELL, 1999, 2001; PISOSCHI; POP, 2015). É menos reativo do que outras espécies, com baixa permeabilidade à membrana, não reage com a maioria das moléculas biológicas em solução aquosa, mas pode se combinar com o óxido nítrico e H_2O_2 e formar espécies mais reativas (JONES, 2016; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser produzido pelas mesmas fontes que o $O_2^{\bullet-}$, já que é gerado pela dismutação deste radical. Outras fontes de H_2O_2 são os processos de degradação de metabólitos peroxissomais, além de oxidases (urato oxidase, glicose oxidase, D-amino oxidase) que podem gerar esta espécie diretamente através da transferência de dois elétrons para o oxigênio molecular (FRANSEN et al., 2012; PISOSCHI; POP, 2015; ANTONENKOV et al., 2010). H_2O_2 é pouco reativo com a maioria das moléculas biológicas, mas reage com selênio, tiol, heme peroxidases ou outros centros metálicos para gerar tanto espécies radicalares quanto não-radicalares (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008).

O radical hidroxil (OH^{\bullet}) é gerado pela reação de Fenton, na qual, em sistemas biológicos, é catalisada pelo Fe^{2+} e é considerado uma espécie com alta taxa de reatividade, a sua vida média é muito curta, assim que é formado, ele reage muito rapidamente com as moléculas próximas, como DNA, proteínas, lipídios, aminoácidos, açúcares e metais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; JONES, 2016; PISOSCHI; POP, 2015).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre inorgânico, que age como sinalizador ou como fator de relaxamento do endotélio, regulador na adesão plaquetária, agregação de leucócitos, e citotoxicidade de macrófagos (FANG, 1997; LIAUDET et al., 2000). O NO é sintetizado através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que converte L-arginina e O_2 a NO e citrulina. Essa espécie reativa de nitrogênio também pode ser formada pela redução de nitratos e nitritos, através da ação da enzima xantina oxidase (FRANSEN et al., 2012).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

Os organismos aeróbicos, possuem mecanismos para a manutenção de concentrações adequadas de EROs, visto que quantidades elevadas dessas substâncias sobrecarregam o

sistema de defesa e podem causar efeitos deletérios como danos às moléculas biológicas e a componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios, levando à condição denominada estresse oxidativo (EO) (SACCOL et al., 2017), que segundo Sies (2015), é um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma ruptura da sinalização e controle redox e/ou dano molecular.

Sies (2018) propõe escalas de intensidade para classificar o EO, que variam de estresse oxidativo fisiológico (eustresse), quando as EROs estão em baixas concentrações nas células e atingem alvos específicos atuando na sinalização redox; a estresse oxidativo tóxico (distresse) quando em altas concentrações de EROs, ocorre a interrupção da sinalização redox e danos a alvos não específicos.

O EO tem como razões, certos fatores como: (i) aumento do nível de compostos endógenos e exógenos que sofrem auto-oxidação aliado à produção de EROs; (ii) depleção de reservas de antioxidantes de baixo peso molecular; (iii) inativação de enzimas antioxidantes; (iv) diminuição na produção de enzimas antioxidantes e antioxidantes não-enzimáticos; além da possibilidade de ocorrer combinações de dois ou mais fatores (LUSHCHAK, 2014).

O NO, pode reagir com o radical superóxido e gerar peroxinitrito (ONOO^-), que atua como oxidante, afetando as funções mitocondriais e desencadeando a morte celular por meio de reações de oxidação e nitração (PACHER et al., 2007; SIES et al., 2017). A produção exacerbada de ERN é conhecida como estresse nitrosativo, que ocorre quando a geração de ERN excede a habilidade do sistema em neutralizá-las e eliminá-las (VILLANUEVA; GIULIVI, 2010).

Dentre os processos que são desencadeados a partir deste excesso de EROs e ERN, estão a lipoperoxidação (LPO), em que são formados os hidroperóxidos de lipídios, que decompõem ligações duplas de ácidos graxos, dessa forma, ocorre oxidação dos fosfolipídios de biomembranas, diminuição da fluidez e alteração da função secretora (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os danos às proteínas podem ocorrer com a formação de dissulfetos mistos com tiois de baixo peso molecular como GSH e cisteína, em que os grupos tiois dos resíduos de cisteína são oxidados levando a mudanças conformacionais e por consequência, na sua função (MARTÍNEZ-RUIZ; LAMAS, 2004; PRIORA et al., 2010); o DNA sofre ataque das EROs, com a indução de mutações, alteração da sua função e formação de 8-hidroxideoxiguanosina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

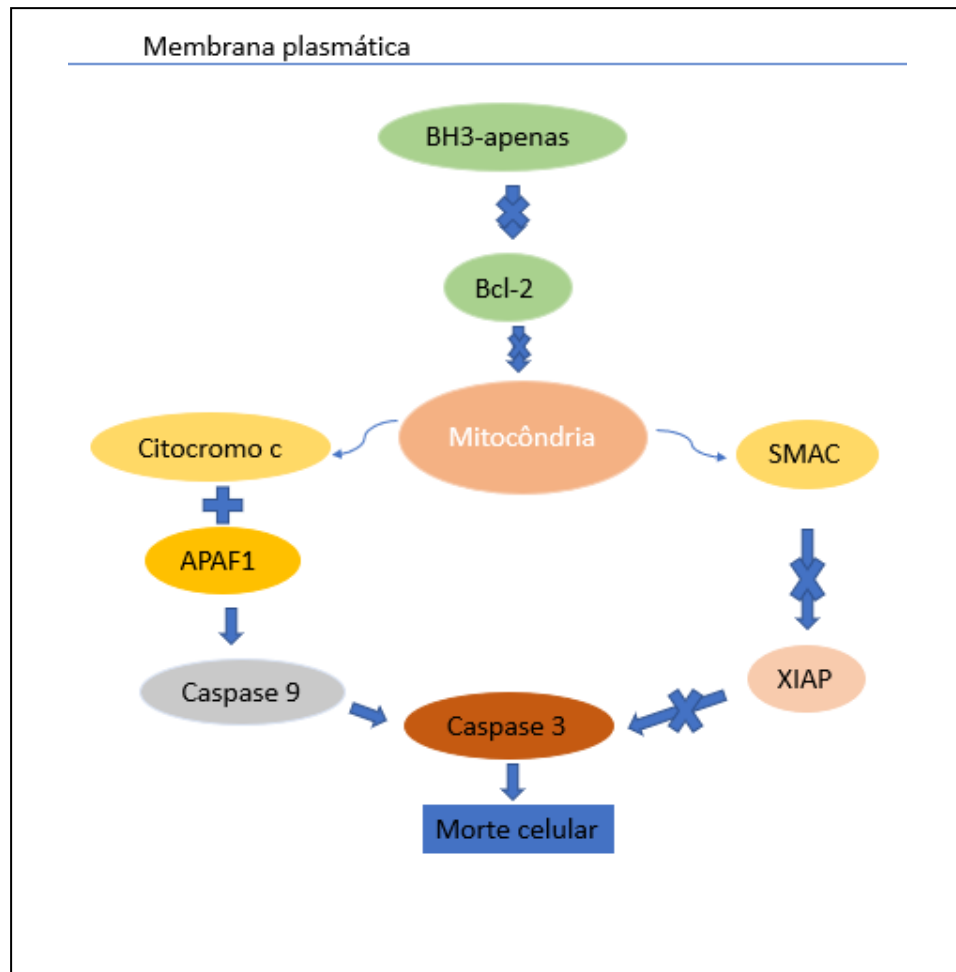
2.3.1 Apoptose e inflamação

A produção excessiva de EROs/ERN, pode levar a morte celular por apoptose, por modificar a permeabilidade da membrana mitocondrial e induzir a liberação de fatores pró-apoptóticos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; CHENG et al., 2015). A apoptose, também chamada de morte celular programada é um mecanismo de substituição celular, remodelação tecidual e remoção de células danificadas. Pode ser iniciada por vários estímulos como radiação ionizante, agentes quimioterápicos, glicocorticoides e agentes oxidantes (OZBEN, 2007).

As EROs/ERN oxidam a cardiolipina, um fosfolípido que compõe a membrana mitocondrial, o que facilita a liberação do citocromo c, um fator pró-apoptótico. No citosol, também ocorre a liberação do segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria (SMAC), que libera a caspase-3 da inibição mediada pelo inibidor da apoptose ligado ao X (XIAP). O citocromo c forma um complexo com Apaf-1 (fator de ativação de apoptose 1) para recrutar e ativar a caspase-9. A caspase-9 ativada, por sua vez, leva a ativação e liberação da caspase-3, que provoca a clivagem de uma série de proteínas, levando à apoptose celular (Figura 3) (IKWEGBUE et al., 2018).

A apoptose pode ser regulada por mecanismos que levam à sua ativação ou inativação, pela atuação de proteínas que podem ser pró ou anti-apoptóticas, como as proteínas da família Bcl-2, que inclui Bcl-2, que inibe a liberação do citocromo c, Bax e Bak, que atuam mediando a permeabilização da membrana externa mitocondrial e BH3- apenas que inibe proteínas anti-apoptóticas, entre outras (PEÑA-BLANCO; GARCÍA-SÁEZ, 2017). A regulação também pode ocorrer através de proteínas que desempenham um papel na promoção da sobrevivência celular, como a Akt que é capaz de fosforilar diferentes moléculas que contribuem para a supressão da apoptose (BRUMATTI et al., 2010).

Figura 3 – Via intrínseca da apoptose



Fonte: Adaptado de Ashkenazi et al. (2017), p. 2.

Estudos relataram que as EROs/ERN estão envolvidas no processo inflamatório, ao agirem como moléculas sinalizadoras e mediadoras da inflamação, estimulando a ativação dos fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B, além de citocinas inflamatórias (BISWAS, 2016; MITTAL et al., 2014).

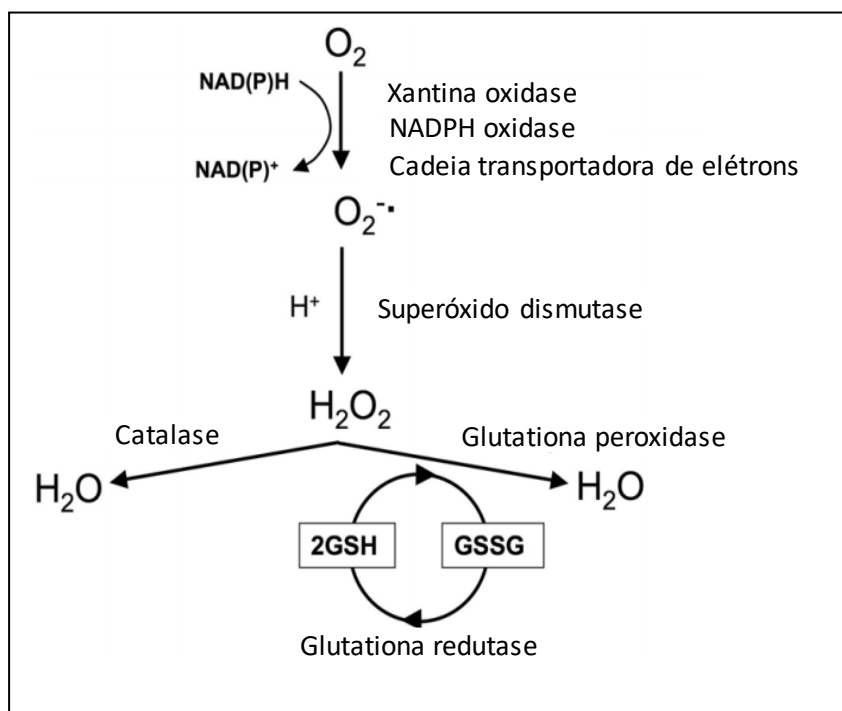
Durante o processo inflamatório, células fagocíticas ativadas como neutrófilos e macrófagos produzem grandes quantidades de EROs que contribuem para a defesa do organismo contra agentes patogênicos, como o ácido hipocloroso que é produzido a partir de Cl⁻ (íon cloreto) e H₂O₂, em uma reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO), uma enzima com atividade abundante em neutrófilos ativados e que é um indicador de infiltrado leucocitário (BISWAS, 2016; POHANKA, 2013).

2.3.2 Sistema de defesa antioxidante

Diante dos efeitos deletérios que as EROs podem causar, e para manter essas substâncias em níveis fisiológicos normais, os organismos aeróbicos possuem um sistema de defesa antioxidante. Um antioxidante é definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas às do substrato oxidável, retarda significativamente ou previne a oxidação daquele substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Essas substâncias podem agir de três formas: através da prevenção, eliminação das EROs formadas e reparo de moléculas modificadas pelas EROs (SIES, 1997). Os antioxidantes são classificados em dois grupos principais: enzimáticos e não-enzimáticos, atuando de forma conjunta para proteger as células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O sistema antioxidante enzimático que representa a primeira linha de defesa, é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST), estas realizam a remoção catalítica do $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , evitando assim, a formação de outras EROs e mantendo a sua concentração dentro dos níveis fisiológicos aceitáveis (Figura 5) (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

Figura 4 – Remoção das EROs pelas enzimas antioxidantes



A SOD realiza a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 , possui mais de um tipo, pois está presente tanto no citosol (CuZn-SOD) quanto no interior da mitocôndria (Mn-SOD). A CAT é a enzima responsável por converter o H_2O_2 em O_2 e H_2O , está localizada principalmente nos peroxissomos, ao realizar esta conversão, diminui o risco da formação do radical hidroxil, que é um radical altamente agressivo, responsável pelo dano oxidativo de muitas biomoléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PISOSCHI; POP, 2015; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

A GPx, é uma enzima que se encontra amplamente distribuída nos tecidos animais, utilizando a forma reduzida da glutatona (GSH), ela catalisa a redução do H_2O_2 (quando em concentrações mais baixas) e de hidroperóxidos orgânicos a água ou outros produtos menos reativos) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PISOSCHI; POP, 2015). A GSSG formada é reciclada a GSH pela ação da enzima GR, ao utilizar o poder redutor da molécula nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) (HERMES-LIMA, 2004). A GST catalisa a conjugação de vários compostos eletrofílicos como radicais livres e xenobióticos pela conjugação com a GSH, facilitando a excreção destes compostos tóxicos (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006).

O mecanismo de defesa antioxidante não-enzimático compreende moléculas hidrossolúveis como, a GSH e o ácido ascórbico (AA) e moléculas lipossolúveis como o α -tocoferol (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005). Esse sistema pode atuar na supressão da formação, eliminação ou desativação das EROs (SIES, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SACCOL et al., 2017).

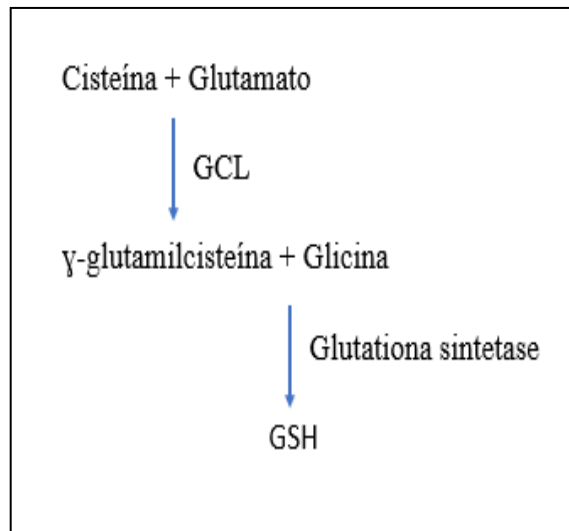
O balanço redox é usado para descrever a proporção entre as formas reduzida e oxidada de uma molécula (VULCANO et al., 2013). Pequenas moléculas como GSH e a forma oxidada GSSG e cisteína e a forma oxidada cistina fazem parte do mecanismo de sinalização redox, que atua em diversos processos metabólicos, como na regulação celular e no controle do crescimento (JONES, 2002).

A GSH é considerada o principal antioxidante endógeno, se oxida facilmente atuando como um redutor celular. Pode ocorrer em duas formas, a tiol-reduzida (GSH), que é a forma predominante, representando cerca de 98% do total, e a dissulfeto-oxidada (GSSG) (LU, 2013). Por possuir grupos sulfidrila em sua estrutura, possui capacidade antioxidante, dessa forma age na detoxificação de EROs e manutenção do equilíbrio redox (AUGUSTO, 2006; SIES, 1999).

O passo limitante na síntese de GSH é a disponibilidade do aminoácido cisteína (TATEISHI et al., 1974) que ao ligar-se ao glutamato, em uma reação catalisada pela enzima

glutamato-cisteína ligase (GCL) forma γ -glutamilcisteína, o segundo passo é catalisado pela enzima glutathiona sintetase que liga glicina a γ -glutamilcisteína (Figura 5) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 5 – Síntese de GSH



Fonte: Próprio autor.

O α -tocoferol, é considerado o mais importante inibidor da LPO *in vivo*, é altamente lipofílico, atua nas membranas e lipoproteínas, agindo como quelante dos oxidantes formados e formando um derivado de baixa reatividade, o tocoferoxil (DIPLOCK et al., 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SACCOL et al., 2017).

O ácido ascórbico é um potente antioxidante hidrossolúvel, encontrado em altas concentrações em vários tecidos, devido à sua propriedade como doador de elétrons, ao interagir com as EROs é oxidado a dehidroascorbato, que é hidrolisado e convertido a substâncias menos reativas. O ácido ascórbico reage com o radical tocoferoxil formado durante a inibição da LPO, regenerando o α -tocoferol, os dois atuam de forma sinérgica (PISOSCHI; POP, 2015; DIPLOCK et al., 1998; AUGUSTO, 2006).

Os flavonoides são eficientes compostos antioxidantes, e essa característica se deve ao número e à posição relativa dos grupos hidroxila ligados a anéis aromáticos na estrutura, que confere poder redutor a estas substâncias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS NA DIETA DE PEIXES

Os peixes, como os animais aquáticos em geral, têm uma alta suscetibilidade ao ataque de EROs, visto que seus tecidos possuem uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, que quando sofrem oxidação provocam efeitos altamente deletérios com danos às biomembranas e por estarem sujeitos às drásticas mudanças que podem ocorrer no ambiente aquático (LI et al., 2003; LIN; SHIAU, 2007; LUSHCHAK, 2016).

Os peixes possuem uma capacidade de se adaptar a diversos estressores ambientais, com situações de alta exposição às EROs, através da atuação das defesas antioxidantes. Estudos têm relatado que o estresse ambiental, como mudanças na salinidade, composição iônica, temperatura e oxigênio, induz EO em peixes, que possuem um sistema antioxidante que depende de certos fatores como idade, comportamento alimentar, fatores nutricionais, fatores ambientais, existência de doenças, entre outros (LUSHCHAK, 2016; MARTÍNEZ-ÁLVARÉZ et al., 2005; SACCOL et al., 2017).

Um dos fatores que pode ser destacado é o controle da dieta para assegurar a obtenção por parte dos animais de quantidades suficientes de nutrientes essenciais para os seus processos fisiológicos, o que reflete em crescimento adequado, saúde e reprodução. A nutrição desempenha importante papel na manutenção do equilíbrio pró-oxidante-antioxidante, diversos estudos têm relacionado os níveis de vitaminas, aminoácidos e outros antioxidantes na dieta dos peixes com o seu perfil oxidativo (WELKER et al., 2013; VIJAYAVEL et al., 2006; TRENZADO et al., 2009; GIRAO et al., 2011; SACCOL et al., 2013).

Em um estudo de Cheng et al. (2018), a suplementação com vitamina E por 60 dias na dieta do peixe *Takifugus obscurus*, sob estresse induzido por amônia, aumentou os níveis das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GR, além de reduzir os níveis de EROs. A dieta contendo vitamina C durante 12 semanas, também foi eficiente na proteção contra o EO, ao aumentar a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx e reduzir a LPO em *Pelteobagrus fulvidacro* Richardson (LIANG et al., 2017).

Peixes da espécie *Cyprinus carpio* alimentados com uma dieta contendo biotina em diferentes concentrações (0,010; 0,028; 0,054; 0,151; 0,330; 1,540 e 2,680 mg de biotina/kg de dieta) durante 63 dias, apresentaram níveis diminuídos de LPO e proteína carbonila no soro, intestino, hepatopâncreas e músculo nas concentrações de 0,054 e 1,540 mg de biotina/kg de dieta. Houve também, um aumento na atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx, GST, GR e no conteúdo de GSH nos tecidos e no soro em todas as dietas testadas, demonstrando que

a biotina, aumenta o *status* antioxidantes desses peixes (FENG et al., 2014). Zhao et al. (2013) demonstraram que a dieta contendo isoleucina (Ile) (4,2; 7,0; 9,0. 11,9; 13,9 e 16,9 g/kg de dieta) em carpa Jian (*C. carpio* var. Jian), aumenta a resistência à *A. hydrophila*. Além disso, essa dieta melhora a resposta imune, a capacidade antioxidante e atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e GST, e diminuiu o conteúdo de malondialdeído (MDA), proteína carbonil e glutatona no rim cefálico.

Estes estudos demonstram que a dieta é um fator de grande importância na modulação do EO e no aumento da resposta antioxidante em peixes cultivados, a adição de substâncias com propriedades antioxidantes como vitaminas ou aminoácidos na dieta pode aumentar a capacidade de eliminação das EROs, inibindo a oxidação de lipídios, além de estimular a atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de antioxidantes não enzimáticos.

2.5 *Aeromonas hydrophila*

As bactérias do gênero *Aeromonas* são amplamente encontradas em ambientes aquáticos, como rios, lagos, lagoas, estuários e lençóis freáticos, e são consideradas patógenos de peixes, anfíbios, répteis e mamíferos além de terem sido identificadas em produtos do gênero alimentício como carnes, peixes, vegetais e alimentos processados, podendo afetar a saúde humana, causando infecções gastrointestinais, e até septicemia em pacientes imunocomprometidos (TOMÁS, 2012; JANDA; ABBOTT, 2010).

Aeromonas hydrophila pertence à família Aeromonadaceae, é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, que apresenta motilidade através de flagelos, sua temperatura ideal de crescimento está em torno de 20°C a 25°C, mas em meios de cultura, também pode crescer a 37°C (AOKI, 1999). Não forma esporos, é capaz de reduzir nitratos a nitritos, de utilizar vários carboidratos, como a glicose, em seu metabolismo, e faz parte da microbiota natural dos organismos aquáticos, em peixes, sendo considerada um dos principais agentes causadores de graves doenças (TOMÁS, 2012; BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004).

Na piscicultura anualmente, são estimadas grandes perdas econômicas, devido às complicações associadas à *A. hydrophila*, que é considerada uma bactéria oportunista, pois é favorecida por condições estressantes relacionadas ao cultivo, como mudanças bruscas na temperatura, pH, alta concentração de amônia, manipulação ou transporte, baixo teor de oxigênio, infecções por parasitas e outras doenças que podem estar acometendo os peixes, o que aumenta a suscetibilidade à invasão de outros patógenos (HAMID et al., 2017; BARCELLOS et al., 2008).

A virulência da *A. hydrophila* é multifatorial, pois para possibilitar a adesão e invasão dos tecidos dos hospedeiros, possui vários fatores de virulência, dessa forma, sua patogênese resulta da produção e ou secreção de citotoxinas, hemolisinas, lipases e proteases, entre outras e também da presença de flagelos, estruturas celulares que possibilitam a formação de biofilme (JANDA; ABOIT, 2010; BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013).

A infecção por *A. hydrophila* em peixes, é transmitida horizontalmente pelas excretas ou lesões da pele (AOKI, 1999) e normalmente pode causar septicemia hemorrágica e doença ulcerativa, que são caracterizadas por lesões superficiais, hemorragia nos opérculos, abscessos, exoftalmia e distensão abdominal, além da ocorrência de acúmulo de líquido ascítico, anemia, danos aos órgãos, com presença de petéquias hemorrágicas nas vísceras, podendo levar à morte celular por apoptose (JANDA; ABOIT, 2010; PAVANELLI et al., 2002). Segundo Schlotfeldt e Alderman (1995), outros sinais clínicos incluem hemorragia nas brânquias e lesões ulcerativas na pele e músculo.

Alterações teciduais têm sido relatadas em estudos com peixes infectados experimentalmente, como em um trabalho de Boijink e Brandão (2001) que avaliou alterações histológicas em juvenis de jundiás infectados por *A. hydrophila*, onde foram observadas em amostras de músculo necrose, hemorragia e infiltrados inflamatórios. Segundo Carraschi et al. (2012) o peixe pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infectado por *A. hydrophila* apresentou fusão lamelar, hemorragia e aumento de células de muco e de cloreto nas brânquias. Segundo Rasmussen-Ivey et al. (2016), após serem desafiados por *A. hydrophila*, foram observadas áreas de hemorragia no músculo, baço e rim cefálico de *Ictalurus punctatus*.

Infecções bacterianas podem induzir resposta ao estresse oxidativo, produção de EROs/ERN e causar depleção do sistema de defesa antioxidante (ZHANG et al., 2018). Um estudo com trutas-marrom desafiadas com *A. hydrophila*, demonstrou redução da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GR em fígado, músculo e coração (*Salmo trutta trutta*) (TKACHENKO et al., 2014). Pan e colaboradores (2016) verificaram uma depleção no conteúdo de GSH, em rim cefálico, baço e pele de carpas capim (*Ctenopharyngodon idella*), desafiadas por *A. hydrophila*.

As bactérias são capazes de ativar proteínas pró-apoptóticas, como caspases, para inativar proteínas anti-apoptóticas, como NF- κ B ou MAP-quinases, nas células infectadas (GRASMÉ et al., 2001). Um estudo demonstrou a indução de apoptose, através da via mitocondrial, pela indução de Bax e supressão de Bcl-2, em carpas-capim desafiadas por *A. hydrophila* (PAN et al., 2016).

A ocorrência de lesões cutâneas, retardo no crescimento e no ganho de peso dos peixes, reduz a produtividade e impede o seu consumo, o que leva os produtores a investirem no uso difundido e indiscriminado de antimicrobianos para tratar as infecções, promover o crescimento e aumentar o desempenho dos peixes o que pode desencadear resistência bacteriana e a presença de resíduos ilegais na carne (CABELLO, 2006; BOIJINK; BRANDÃO, 2001).

Neste contexto, tem sido cada vez maior a busca por alternativas naturais, que além de diminuir os custos, são também mais adequadas, do ponto de vista ambiental quando comparadas aos compostos sintéticos.

2.6 FLAVONOIDES

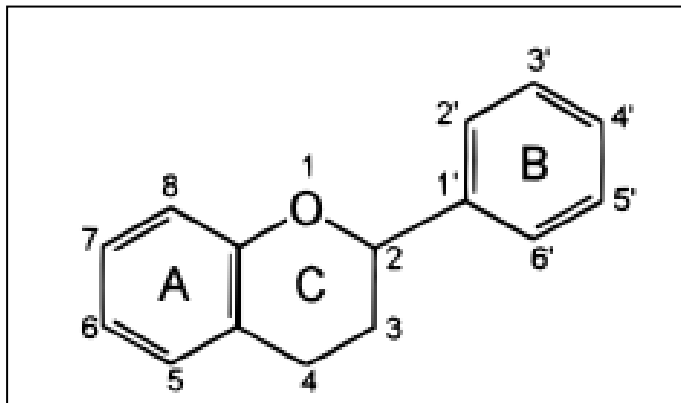
A busca crescente por alternativas naturais na produção animal, como na piscicultura, levou ao estudo das propriedades terapêuticas das plantas, com o isolamento e caracterização de diversos componentes bioativos dos vegetais, que devido às suas características, podem ser benéficos aos peixes, diminuindo os efeitos adversos, se comparados aos antibióticos, por exemplo. Um dos componentes naturais que vem sendo explorados, são os flavonoides, que são pigmentos hidrossolúveis presentes nos vacúolos das células vegetais (RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2014).

Eles fazem parte da classe de metabólitos secundários, junto com os terpenoides e alcaloides, e possuem uma variedade de funções, como dar às flores e alimentos tons de amarelo, laranja e vermelho, agir como filtros UV, como moléculas sinalizadoras, e também em resposta à infecção bacteriana (RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2014; KUMAR; PANDEY, 2013; PANCHE et al., 2016; TAKAHASHI; OHNISHI, 2004). Sua estrutura básica é composta por 15 átomos de carbono, arrançados em dois anéis de benzeno (A e B) ligados através de um anel (C) pirano ou pirona heterocíclico (com uma ligação dupla) no meio (Figura 6). São subdivididos de acordo com seus substituintes em flavanóis, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, flavonas, flavanas, flavanonas, isoflavonas, chalconas e neoflavonoides. (RICE-EVANS et al., 1997; MIDDLETON et al., 2000).

Dentre as propriedades dessa classe de substâncias, a mais bem descrita é, a capacidade de atuar como antioxidante, cujos efeitos são mediados pelos grupos funcionais hidroxil, sua configuração, substituição e número total determinam sua atuação como quelante de íons metálicos (prevenindo a formação de EROs e ERN) e no mecanismo de eliminação de radicais livres. Os flavonoides são oxidados pelos radicais, tornando-os mais estáveis e menos reativos, dessa forma, estabilizam as espécies reativas de oxigênio, isso ocorre pela capacidade dos

grupos hidroxil doarem hidrogênios e elétrons para radicais hidroxil, peroxil e peroxinitritos (KUMAR; PANDEY, 2013; HEIM et al., 2002; PANCHE et al., 2016; POURCEL et al., 2007).

Figura 6 – Estrutura química básica dos flavonoides



Fonte: Adaptado de Pietta (2000), p. 1036.

Os flavonoides são encontrados em legumes, nozes, sementes, ervas, especiarias, caules, flores, vinho tinto, frutas (uva, cereja, maçã, groselha), além de serem importantes componentes das frutas cítricas (BARNES et al., 2001). São substâncias de grande interesse, pelo seu potencial no desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas e herbicidas (RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2014). Estudos vêm sendo realizados para entender melhor as atividades biológicas dos flavonoides e suas aplicações, e revelam que estes possuem efeitos anti-inflamatórios (WIDLANSKY et al., 2005), anticâncer (ARAFÁ et al., 2009), antidiabéticos (BAHADORAN et al., 2013), antibacterianos (PIMENTEL et al., 2013), antioxidantes (RICE-EVANS et al., 1996; PIETTA, 2000).

Tendo em vista, os benefícios que podem trazer, em especial, pela sua capacidade de atuar como antioxidante, flavonoides estão sendo utilizados como aditivos em formulações de dietas para peixes. Em um estudo realizado por Pês et al. (2016), jundiás alimentados com dieta contendo o flavonoide quercetina nas concentrações 1.5 g e 3 g/kg de dieta, apresentaram níveis diminuídos de LPO, em todos os tecidos avaliados, aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST e do conteúdo de tios não-proteicos, capacidade antioxidante total e ácido ascórbico em encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo. Em um estudo de Li et al. (2019), foram avaliados os efeitos dos flavonoides do *Allium mongolicum* nas concentrações 10, 20 ou 40 mg/kg na dieta do peixe *Chana argus*, foi demonstrado que

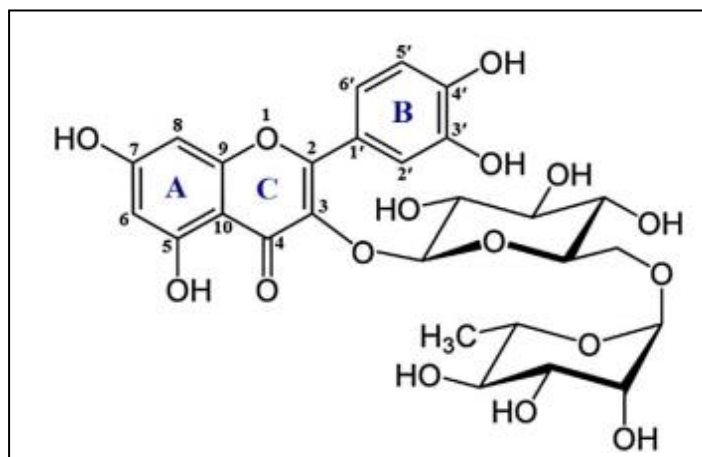
houve aumento no crescimento, melhora na resposta antioxidante e imune e maior resistência contra a bactéria *A. hydrophila*.

2.6.1 Flavonoide Rutina

A rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,5,7,3',4' pentahidroxi-flavona) é um flavonoide que pertence à classe dos flavonóis, é uma substância de cor amarelada, e pode ser amplamente encontrada em vegetais e frutas, como por exemplo, laranja, limão, lima pêssago, maçã, chá verde, semente de uva, e trigo sarraceno, que é considerado uma importante fonte alimentar de rutina (ATANASSOVA; BAGDASSARIAN, 2009; JANBAZ et al., 2002; YANG et al., 2008). Seu nome vem da planta *Ruta graveolens*, que também contém este flavonoide (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017).

Classificada como um glicosídeo, pois possui um açúcar na sua estrutura e a molécula da rutina é derivada do flavonol quercetina (AHERNE; O'BRIEN, 2002). De modo geral, quimicamente, os flavonóis possuem um grupo hidroxila na posição 3 do anel C, mas no caso da rutina, ocorre a presença de um dissacarídeo rutinose na posição 3 deste anel aromático (Figura 7) (PANCHE et al., 2016; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

Figura 7 – Estrutura do flavonoide rutina



Fonte: Adaptado de Ghorbani (2017), p. 306.

A rutina é absorvida mais lentamente do que a molécula da qual deriva, a quercetina, devido à porção de açúcar contida em sua estrutura, mas ela é totalmente hidrolisada por enzimas intestinais e bactérias da microflora digestiva em quercetina 3-glicosídica e quercetina

aglicona, que são moléculas menores, melhores absorvidas e metabolizadas (HOLLMAN; KATAN, 1997; WALLE, 2004; MARCARINI, 2013).

Por possuir ampla variedade de efeitos biológicos, a rutina vem sendo estudada em diversas áreas. Segundo Ghorbani (2017), a rutina possui propriedades antidiabéticas, por atuar melhorando o perfil glicêmico e lipídico em ratos diabéticos tipo 1, pela administração oral de rutina 50 ou 100 mg/kg, diminuindo significativamente os níveis de glicose em jejum, possivelmente por inibir enzimas envolvidas na digestão de carboidratos.

De acordo com Orhan et al. (2010), a rutina demonstrou possuir atividades antibacteriana e antifúngica contra cepas padrão de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e *Candida krusei*. A rutina também foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* e *Klebsiella sp* (ARARUNA et al., 2012; PIMENTEL et al., 2013).

O efeito neuroprotetor também tem sido investigado, como no estudo de Javed et al. (2012), no qual em ratos, após indução de inflamação com a injeção intracerebroventricular de estreptozotocina, a rutina demonstrou reduzir a neuroinflamação, através do aumento do status antioxidante endógeno e inibição do déficit comportamental, peroxidação lipídica e marcadores inflamatórios.

A fim de investigar seu efeito anti-apoptótico, a rutina foi administrada de forma profilática via oral nas doses de 75 e 150 mg/kg de peso corporal em ratos com inflamação renal induzida por cisplatina. Foi observado um efeito benéfico da rutina, sua ação foi mediada pela inibição da apoptose de células tubulares mediadas por caspase 3 e das vias do NF-KB e TNF- α , que estão envolvidas na ativação de citocinas inflamatórias (ARJUMAND et al., 2011).

A rutina extraída de *Toona sinensis* administrada em camarões brancos (*Litopenaeus vannamei*) nas doses 10, 20 ou 50 mg/g demonstrou aumentar a resistência contra o patógeno *Vibrio alginolyticus*, ao diminuir os níveis de glicose, lactato e lipídios (HSIEH et al., 2008). Em um estudo feito em ratos a administração de rutina via oral nas doses de 25, 50 ou 100 mg/kg, melhorou parâmetros de imunidade celular e humoral, houve aumento nos níveis de imunoglobulinas e o funcionamento dos leucócitos foi restaurado (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017).

A maioria dos efeitos biológicos da rutina, é atribuída principalmente à sua potente atividade antioxidante (GULLÓN et al., 2017) que se dá pela sua ação como “scavenger” de radicais livres e como quelante de metais de transição, pela sua capacidade de doar elétrons para radicais livres reativos, convertendo-os em espécies mais estáveis (YANG et al., 2008). Essa capacidade antioxidante é devida principalmente à presença de anéis fenólicos e grupos

hidroxila livres na estrutura química, que poderiam doar hidrogênio para evitar mais oxidação (CHUA, 2013).

Nazeri e colaboradores (2017) verificaram aumento das atividades das enzimas SOD e CAT em trutas arco-íris alimentadas com rutina na dose de 1 mg/kg de dieta e oxitetraciclina (OTC) na dose 75 mg/kg de peso corporal, quando comparadas ao grupo onde foi adicionado apenas OTC na ração. Em um estudo de Pês et al. (2016), a rutina (1.5 g ou 3 g/kg de dieta) na dieta de jundiás diminuiu a LPO, aumentou a atividade das enzimas SOD, CAT e GST, além de aumentar os níveis dos antioxidantes não-enzimáticos GSH e ácido ascórbico. Em camundongos com lesão renal aguda induzida por lipopolissacarídeo via intraperitoneal (10 mg/kg), a administração via oral de rutina (50 ou 200 mg/kg), reduziu níveis séricos de creatinina e restaurou os níveis renais de MDA e glutathiona (GSH), e a atividade da SOD e CAT, além disso, também houve redução significativa das citocinas inflamatórias (KHAJEVAND-KHAZAEI et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito protetor da dieta contendo rutina no músculo de jundiás infectados com *A. hydrophila*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as possíveis alterações inflamatórias no músculo de jundiás dos grupos controle, rutina 0,15%, *A. hydrophila*, rutina 0,15% + *A. hydrophila*;
- Verificar se há indução de apoptose nos diferentes grupos experimentais;
- Analisar o estado redox da glutathiona nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a possível formação de dissulfetos mistos nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a síntese de GSH nos diferentes grupos experimentais;
- Determinar a provável dano oxidativo aos lipídios nos diferentes grupos experimentais;
- Verificar a possível alteração da resposta antioxidante nos diferentes grupos experimentais.

4 MANUSCRITO

O manuscrito está disposto conforme as normas requisitadas pela revista *Fish and Shellfish Immunology*, o qual foi submetido para publicação.

Dietary addition of rutin enhances non-specific immune responses, improving *Aeromonas hydrophila*-induced inflammation, apoptosis and oxidative stress in muscle of silver catfish (*Rhamdia quelen*)

Vanessa M. da Rosa^a, Karine Ariotti^a, Caroline A. Bressan^a, Elisia G. da Silva^a, Magale Dallaporta^b, Guerino B. Júnior^a, Silvio T. da Costa^b, Agueda C. de Vargas^c, Bernardo Baldisserotto^a, Isabela A. Finamor^{a*}, Maria A. Pavanato ^{a*}

^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil; ^bDepartment of Morphology, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil; ^cDepartment of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

Corresponding authors:

Isabela A. Finamor - E-mail: isabela.finamor@gmail.com

Maria A. Pavanato - E-mail: amaliapavanato@yahoo.com.br

Department of Physiology and Pharmacology
Universidade Federal de Santa Maria
Avenida Roraima, 1000
Camobi, 97105-900
Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil
Tel.: +55 55 32209381 Fax: +55 55 32208241

Abstract

This research aimed to assess the influence of dietary addition of rutin on inflammation, apoptosis and antioxidant responses in muscle of silver catfish (*Rhamdia quelen*) challenged with *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*). For this purpose, fish were split into four groups as follows (in triplicate, $n = 12$): control, 0.15% rutin, *A. hydrophila*, 0.15% rutin + *A. hydrophila*. After 2 weeks of feeding with standard or rutin diets, fish were challenged with *A. hydrophila* for 1 week or received sterile saline. The animals were then anesthetized with eugenol and euthanized to collect muscle. The histological analysis reveals that the dietary addition of rutin abrogates *A. hydrophila* induced-hemorrhage and inflammatory infiltration. Accordingly, it also reduces *A. hydrophila* induced-myeloperoxidase activity. Dietary addition of rutin decreases *A. hydrophila* induced-apoptosis through decreasing the ratio of Bax to Bcl-2 and increasing phospho-Akt to Akt ratio, as showing by Western blotting analysis. Accordingly, it also diminishes the *A. hydrophila* induced-rise in nitric oxide and superoxide anion levels and reestablishes superoxide dismutase activity. Furthermore, although such treatment is unable to recover the levels of reduced glutathione (GSH), cysteine and glutamate cysteine ligase, which are depleted as a result of *A. hydrophila* infection, it diminishes the oxidized glutathione (GSSG) content, thus decreasing GSSG to GSH ratio, a marker of oxidative stress. Dietary addition of rutin also increases cysteine residues of proteins and diminishes those of thiol-protein mixed disulfides, whose levels were changed after *A. hydrophila* challenge. Finally, it reduces *A. hydrophila* induced-lipid peroxidation, measured as lipid hydroperoxides and thiobarbituric acid reactive substances; markedly elevates ascorbic acid and also reestablishes total antioxidant capacity, whose levels were decreased after *A. hydrophila* challenged. In conclusion, the dietary addition of rutin at 0.15% improves the *A. hydrophila*-induced inflammation, inhibits *A. hydrophila*-induced apoptosis and promotes cell survival. It also reduces the *A. hydrophila*-induced oxidative stress and stimulates the antioxidative responses, thus protecting the lipids against the oxidative damage in muscle of *A. hydrophila*-infected silver catfish. Therefore, the dietary addition of rutin might be considered an important approach to protect the muscle, an important focus of immune reactions, during a challenging situation in silver catfish, as *A. hydrophila* infection.

Keywords: rutin, inflammation, apoptosis, antioxidant, *Aeromonas hydrophila*, silver catfish.

1 Introduction

Fish often suffer from several stress factors during modern intensive culture, as grading, transportation and others [1]. Such stressors can compromise their defense mechanisms, increasing their susceptibility to various pathogens [2], including *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) [3]. *A. hydrophila* is a ubiquitous, free-living, Gram-negative motile bacilli [3]. It is an opportunistic pathogen infecting fish under stressful conditions, resulting in huge losses in farmed and feral fishes including silver catfish (*Rhamdia quelen*), which is a fast-growing species native to South Brazil with great economic importance [4–7].

Gill and skin rot, fatal hemorrhagic septicemia are features of *A. hydrophila*-induced infection. Chen and Lu [8] using a green fluorescent protein as a marker, that wounds in these two tissues, gill and skin, are the main routes of entry for *A. hydrophila*, which is able to adhere and proliferate on the body surface of Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*), invading the muscle. It was shown that *A. hydrophila* reduces the non-specific immune responses in fish [9–12], leading to inflammation [13–17], apoptosis [10,11,18] and oxidative damage [9–12], thus decreasing fish resistance to pathogen infection and their survival rate [9–12].

The traditional application of antibiotics has partial success in the management of this disease, since it triggers drug resistant strains in such pathogens [3]. It is well known that nutritional approaches are essential to alleviate disease among farmed fish since they could stimulate their immune system, thus abrogating their inflammatory responses [19]. It was shown that the utilization of diets containing antioxidants as reduced glutathione (GSH) [9], ascorbic acid (AA) [11], α -tocopherol [12], α -lipoic acid [20], quercetin [21,22] and rutin [23,24] is an emerging trend increasing worldwide, since it produces little side effects, reduces costs [3].

Indeed, as Hsieh et al. [25], rutin from *Toona sinensis* stimulates innate non-specific immune response and enhances the survival rate of *Vibrio alginolyticus*-challenged white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Moreover, rutin from *Sesbania grandiflora* exhibits antibacterial properties in fish meat [26]. The flavonoid rutin (quercetin-3-O-rutinoside) is found in most plant species, including passion flower, buckwheat, tea and apple [27]. Rutin has been shown to be beneficial to aquatic organisms, since it also improves antioxidant [23,28] and anti-inflammatory responses in fish [24]. However, it is unknown how rutin acts in response to a challenging situation in silver catfish, as *A. hydrophila* infection. Therefore, the main

purpose of this research is to assess the influence of dietary addition of rutin at 0.15% on inflammation, apoptosis and antioxidant responses in muscle of silver catfish challenged with *A. hydrophila*.

2 Materials and methods

2.1 Fish and culture conditions

Silver catfish (150.6 ± 25.5 g, 22.8 ± 2.7 cm) fishes from a local producer were randomly distributed in 12 polypropylene tanks (250 l), 10 fish per tank, and acclimated for 2 weeks, with constant aeration, daily watering and siphoning. The water parameters were checked daily (temperature: $21.1 \pm 0.10^\circ\text{C}$, dissolved oxygen: 6.87 ± 0.18 mg l⁻¹, total ammonia: 2.73 ± 0.3 mg l⁻¹, nitrites: 0.81 ± 0.08 mg l⁻¹) or weekly (pH: 7.1 ± 0.09). Ethics Committee on the Use of Animals of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) approved the experimental protocol (#8135140917).

2.2 Diets

Diets were prepared according to Pês et al. [23]. For this purpose, the ingredients were weighed and subsequently mixed until complete homogenization. After mixing, the diets were moistened, pelleted in a meat grinder and taken to a forced air circulation oven for drying for 24 h at 55°C. The composition of the standard diet is showed in Table 1. Rutin at 0.15% was added in the diets at together with the rice bran. Silver catfish were fed twice daily at 8 a.m. and 7 p.m. for 3 weeks in an amount fixed in 3% of the biomass of each tank.

2.3 Challenge with *A. hydrophila*

A. hydrophila isolate was obtained from a naturally infected silver catfish. Silver catfish were inoculated intramuscularly with 0.1 ml of *A. hydrophila* solution (1.5×10^9 CFU ml⁻¹; OD₆₀₀=1.2) on the right lateral-dorsal side. Uninfected fish received the same dose of sterile saline through the same route. The challenge test was conducted for 1 week.

2.4 Experimental design

Fish were split into four groups as follows (in triplicate): (1) control, (2) 0.15% rutin, (3) *A. hydrophila*, (4) 0.15% rutin + *A. hydrophila*. After 2 weeks of feeding with standard or 0.15% rutin diets, fish were infected with *A. hydrophila* or received sterile. At the end of the experimental period, fish were anesthetized with 50 mg ml⁻¹ eugenol and euthanized to collect muscle. The samples were kept in sterile plastic tubes, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analyzes.

2.5 Assays

2.5.1 Histology

Tissue samples were fixed in 10% formaldehyde, processed, embedded in paraffin and stained with Goldner's trichromium to detect morphological changes. Tissue sections were observed through the Axio Scope.A1 microscope (Zeiss, Jena, Germany) and photographed using Axiocam 105 color coupled digital camera (Zeiss, Jena, Germany). A quantitative analysis was performed for the inflammatory infiltrate; for this purpose, the images were divided into twelve quadrants of 3500 µm². On the other hand, for hemorrhage, the analysis was done assigning scores from 0 to 4, dividing the images into six quadrants of 6350 µm². ImageJ software was utilized to analyze both measurements.

2.5.2 Myeloperoxidase

Tissue samples were homogenized with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM phosphate buffer pH 6.0 and afterwards submitted to three cycles of freezing and thawing. They were then incubated at 60°C for 2 h and spin down at 15000 g for 15 min at room temperature [29]. The supernatants were used in the assay. It was carried out in a plate through the addition of sample aliquots to 1.6 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and 0.3 mM H₂O₂. The plates were incubated at 37°C for 5 min and the reaction was stopped by the addition of 0.8 N H₂SO₄. The absorbance was measured at 450 nm. All spectrophotometric measurements using plates were made in a plate reader FlexStation 3 Multi-Mode Microplate

Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The myeloperoxidase activity (MPO) was calibrated against horseradish peroxidase standards and expressed as mU g tissue⁻¹. One MPO unit was defined as the amount of the oxidized TMB in one minute [30].

2.5.3 Western blotting

Tissue samples were homogenized with lysis buffer containing 25 mM HEPES buffer pH 7.4, 75 mM NaCl, 0.75 mM magnesium chloride, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, 0.5% Nonidet-P40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and centrifuged at 15000 g for 15 min at 4°C. The supernatants were used in the assay. Protein levels were measured using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Proteins (30 µg) were separated through electrophoresis using 10, 12 and 14% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. They were then transferred to nitrocellulose membranes through a TE77 Semi-Dry Transfer Unity (GE Healthcare, Chicago, USA). The non-specific protein-binding sites were blocked through the membrane incubation with 5% bovine serum albumin for 1 h under agitation at room temperature. The membranes were managed for immunodetection using anti-phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology, Danvers, USA), anti-Akt (Cell Signaling Technology, Danvers, USA), anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and anti-catalytic subunit of glutamate cysteine ligase (GCLc) antibodies (Abcam, Cambridge, UK). They were revealed through chemiluminescence utilizing Clarity™ Western ECL Botting Substrates (Biorad, Hercules, USA) using a ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad, Hercules, USA). Ponceau S staining was applied to normalize the results from each membrane.

2.5.4 Superoxide anion

Tissue sections were placed in vials and incubated with a buffer containing 20 mM HEPES pH 7.4, 119 mM NaCl, 4.6 mM potassium chloride, 1 mM magnesium sulfate, 0.15 mM disodium phosphate, 0.4 mM potassium phosphate, 5 mM sodium bicarbonate, 1.2 mM calcium chloride, 5.5 mM glucose and also 0.1 mM nitro blue tetrazolium at 37°C for 2 h. The reaction was stopped by the addition of 0.5 N HCl. The absorbance was measured at 540 nm. All spectrophotometric measurements using cuvettes were made in a T60 UV-visible

spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). The superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) levels were expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{g tissue}^{-1}$ using $\epsilon=0.072 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [31].

2.5.5 Cysteine

Tissue samples were homogenized with ice-cold 5% 5-sulfosalicylic acid and centrifuged at 15000 g for 15 min at 4°C [32]. The supernatants were used in the assay. It was performed through the addition of sample aliquots to tubes containing acetic acid and ninhydrin reagent in concentrated acetic acid and HCl. The tubes were heated in a boiling-water bath for 10 min. They were then rapidly cooled on ice and the contents of the tubes were diluted with 95% ethanol. The absorbance was measured in cuvettes at 560 nm. The cysteine levels were calibrated against cysteine hydrochloride standards and expressed as $\mu\text{mol g tissue}^{-1}$ [33].

2.5.6 Reduced and oxidized glutathione

Tissue samples were split into two parts. First, one part was homogenized with ice-cold 50 mM Tris buffer pH 8.0, 31 mM N-ethylmaleimide. The homogenates were incubated at for 2 min at room temperature, precipitated adding 6% TCA and centrifuged at 14000 g for 2 min at room temperature. The supernatants were extracted with three volume of dichloromethane, incubated for 5 min at room temperature and centrifuged at 14000 g for 30 s. The supernatants were used for the analysis of oxidized glutathione (GSSG). It was carried out by the addition of sample aliquots to a cuvette containing 200 mM phosphate buffer pH 7.4, 0.1 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 9.5 μM NADPH, 2.5 U ml^{-1} glutathione reductase (GR). The absorbance was recorded at 412 nm for 1 min. After the initial 1-min reading, 0.1 μM GSSG was added to the cuvette and the absorbance was measured at 412 nm for 1 additional minute. The GSSG levels were expressed as $\mu\text{mol g tissue}^{-1}$ and calculated as follows: Calculate $S = \text{slope sample} - \text{slope blank}$; Calculate $St = (\text{slope sample} + \text{GSSG}) - \text{slope sample}$; $\text{GSSG} = S \times [\text{GSSG}_c] / St \times 49.5$ (sample dilution in the cuvette) $\times 2$ (dilution due to the acidification), where $[\text{GSSG}_c]$ is the final concentration of standard GSSG in the cuvette (0.1 μM). Finally, the other part was homogenized with ice-cold 7.5% trichloroacetic acid (TCA). The homogenates were incubated at room temperature for 2 min and centrifuged at 14000 g for 2 min at room temperature. The supernatants were used for the determination of total glutathione. It was performed though the addition of sample aliquots to a cuvette containing 200 mM

phosphate buffer pH 7.4, 0.1 mM DTNB, 9.5 μM NADPH, 2.5 U ml^{-1} GR. The absorbance was recorded at 412 nm for 1 min. The GSH levels were calibrated against GSH standards. They were obtained through subtracting the measured amounts of GSSG (multiplied by 2, since in the recycling method one molecule of GSSG is reduced to two molecules of GSH) from the levels of total glutathione. Results were expressed as $\mu\text{mol g tissue}^{-1}$ [34].

2.5.7 Cysteine residues of proteins and thiol-protein mixed disulfides

Tissue samples were homogenized with ice-cold 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.5, 2.5 mM EDTA. The homogenates were precipitated adding 6% TCA and centrifuged at 7000 g for 4 min at room temperature. The pellets and supernatants were used for the analysis of thiol-protein mixed disulfides (PSSX) and of cysteine residues of proteins (PSH), respectively [35]. First, for PSSX analysis, the pellets were washed with 1.5% TCA and centrifuged at 7000 g for 4 min at room temperature. The samples were resuspended with 200 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, 1 mM EDTA and 1 N NaOH was added to bring pH 8.2-8.4. The samples were incubated for 30 min under agitation at room temperature and precipitated with 6% TCA. They were centrifuged at 7000 g for 4 min at room temperature. The supernatants were used in the assay. It was carried out by the addition of sample aliquots to a cuvette containing 200 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 and 0.16 mM DNTB. The absorbance was measured at 410 nm. The PSSX levels were expressed as $\mu\text{mol g tissue}^{-1}$ using $\epsilon=13.64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Finally, for PSH determination, the supernatants were precipitated with 6% TCA and centrifuged at 7000 g for 4 min at room temperature. The pellets were washed twice with 1.5% TCA, centrifuged at 7000 g for 2 min at room temperature and resuspended in 200 mM sodium phosphate buffer pH 7.4. 10 mM DNTB was added to the samples that were incubated for 10 min under agitation at dark at room temperature and afterwards centrifuged at 7000 g for 5 min at room temperature. The supernatant aliquots were then added to a cuvette containing 100 mM sodium phosphate. The absorbance was recorded at 410 nm. The PSH levels were expressed as $\mu\text{mol g tissue}^{-1}$ using $\epsilon=13.64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.5.8 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assessed using two techniques: lipid hydroperoxides (LOOH) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [36]. First, for LOOH determination,

tissue sample were homogenized with ice-cold 100% methanol and centrifuged at 1000 g for 5 min at 4°C. The supernatants were used in the assay. It was performed by the addition of sample aliquots to tubes containing the following reagents, which were added in the subsequent order: 0.25 mM iron sulfate, 0.05 N H₂SO₄, 0.1 mM xylene orange and water. The samples were incubated for 1 h at room temperature. The absorbance was recorded in cuvettes at 580 nm. A further addition of 8 μM hydrogen peroxide (H₂O₂) was then made. The samples were again incubated for 40 min at room temperature and the absorbance was read at 580 nm. The LOOH levels were expressed as nmol g tissue⁻¹ using the following formula: $A_{580 \text{ nm sample}}/A_{580 \text{ nm } 8 \text{ nmol H}_2\text{O}_2} \times 8 \text{ nmol H}_2\text{O}_2 \times 1000/V_1 \times 6$, where V₁ is the volume of sample aliquot used in the assay and the factor “6” presumes a 1:5 (w/v) methanolic homogenate. Finally, for TBARS determination, tissue samples were homogenized with ice-cold 1.1% phosphoric acid and centrifuged at 1000 g for 5 min at 4°C. The supernatants were used in the assay. It was performed by the addition of sample aliquots to tubes containing 1.4% phosphoric acid and solution composed of 0.4% thiobarbituric acid, 20 mM NaOH and 40 μM butylated hydroxytoluene. The tubes were heated in a boiling-water bath for 45 min. They were rapidly cooled on ice and then butanol was added. Finally, the tubes were vortexed and centrifuged at 1000 g for 5 min at room temperature. The organic layer was removed and placed in a cuvette. The absorbance was measured at 532 nm. The TBARS levels were expressed as nmol g tissue⁻¹ using $\epsilon=156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.5.9 Ascorbic acid

Tissue samples were homogenized with 4% TCA. The homogenates were incubated for 5 min at room temperature and centrifuged at 1000 g for 5 min at 4°C. The supernatants were then incubated with acid-washed norit, thoroughly vortexed and filtrated. The filtrates were used in the assay. It was carried out by the addition of sample aliquots to tubes containing 0.13% thiourea and 0.2% 2,4'-dinitrophenylhydrazine. It was incubated for 3 h at 37°C. The tubes were placed in ice water bath and 32N H₂SO₄ was slowly added. They were incubated for 30 min at room temperature. The absorbance was measured in cuvettes at 540 nm. The AA levels were calibrated against AA standards and expressed as μmol g tissue⁻¹ [37].

2.5.10 Nitric oxide

Tissue samples were homogenized with ice-cold 50 mM Tris buffer pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet-P40 and 1 mM PMSF. The homogenates were centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C and the supernatants obtained were kept at -80°C until use. They were used in all analyzes that will be described below. Nitric oxide (NO) levels were measured as nitrites and nitrates. Nitrites were measured in plates through the addition of sample aliquots to Griess reagent. The absorbance was recorded at 550 nm. The nitrite levels were calibrated against sodium nitrite standards. Nitrates were determined as total nitrite (sum of pre-existing nitrite and nitrite derived from nitrate) through the conversion of nitrate to nitrite using *Aspergillus* nitrate reductase (NR). It was performed in plates by the addition of sample aliquots to a reaction mixture containing 70 mM Tris buffer pH 7.5, 2 μM NADPH, 1 mM glucose 6-phosphate, 0.3 U ml⁻¹ glucose 6-phosphate dehydrogenase and 0.1 U ml⁻¹ NR. The plates were incubated for 30 min at room temperature. Then, they were incubated with Griess reagent for 10 min at room temperature. The absorbance was measured at 550 nm. The nitrate levels were calibrated against sodium nitrate standards. Results were expressed as μmol g tissue⁻¹ [38].

2.5.11 Antioxidant enzymes

Total superoxide dismutase (SOD) was assayed through the addition of sample aliquots to a cuvette containing 50 mM glycine buffer pH 10.2 and 1 mM epinephrine pH 2.0. The absorbance was recorded at 480 nm at 30°C for 1 min. Its activity was expressed as USOD g tissue⁻¹ using $\epsilon=4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. One SOD unit was defined as the amount of the enzyme required for 50% inhibition of the adrenochrome formation [39]. GR assay was performed by the addition of sample aliquots to a cuvette containing 200 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, 10 mM EDTA and also 2.5 mM GSSG and 0.1 mM NADPH. The absorbance was recorded at 340 for 1 min. Its activity was expressed as mmol g tissue⁻¹ using $\epsilon= 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [40].

2.5.12 Total antioxidant capacity

A solution containing 5 mM 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) and 0.15 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in 20 mM phosphate buffer pH 7.0 was incubated for 50 min at 45°C. The resulting solution was afterwards rapidly cooled on ice and kept at 4°C until use. The assay was carried out by the

addition of sample aliquots to plates containing the ABTS-APPH solution at 22°C. The absorbance was recorded at 734 nm for 1 min. The total antioxidant capacity assay (TAC) was calibrated against AA standards and expressed as $\mu\text{mol g tissue}^{-1}$ [41].

2.6 Statistical analysis

The statistical analysis was made using the software Statistica™ (Statsoft, Tulsa, USA). Levene's Test was used to evaluate the data homogeneity. The data were compared through two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. Results are reported as mean \pm standard error and the differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

3 Results

3.1 Inflammation

A. hydrophila triggers a markedly increase in hemorrhage (Fig. 1A and 1B) ($P < 0.05$) and inflammatory infiltrate levels in muscle of silver catfish (Fig. 1A and 1B) ($P < 0.05$). The dietary addition of rutin reduces hemorrhage (Fig. 1A and 1B) ($P < 0.05$) and inflammatory infiltrate contents in muscle of *A. hydrophila*-infected silver catfish (Fig. 1A and 1B) ($P < 0.05$). Similar to the histological analysis, the dietary addition of rutin abrogates the *A. hydrophila*-induced MPO activity in muscle, a marker of inflammatory infiltrate (Fig. 1C) ($P < 0.05$). However, although reduced, these MPO values are still higher than those of the control (Fig. 1C) ($P < 0.05$).

3.2 Apoptosis

A. hydrophila increases the content of the proapoptotic protein Bax (Fig. 2A) and reduces the levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Fig. 2A), thus increasing the ratio of Bax to Bcl-2, an indicator of cell apoptosis (Fig. 2A) ($P < 0.05$). It also reduces phospho-Akt to Akt ratio in muscle of silver catfish (Fig. 2B) ($P < 0.05$). The dietary addition of rutin decreases Bax content (Fig. 2A), thus reducing the ratio of Bax to Bcl-2 (Fig. 2A) ($P < 0.05$). It also increases

phospho-Akt to Akt ratio, a marker of cell survival, in muscle of *A. hydrophila*-challenged silver catfish (Fig. 2B) ($P < 0.05$).

3.3 Superoxide anion, superoxide dismutase and nitric oxide

A. hydrophila triggers a rise in NO (Fig. 3A) ($P < 0.05$) and O_2^{\bullet} levels (Fig. 3B) ($P < 0.05$) and a reduction in SOD activity in muscle of silver catfish (Fig. 3C) ($P < 0.05$). The dietary addition of rutin decreases NO content (Fig. 3A) ($P < 0.05$) and increases SOD activity in muscle of *A. hydrophila*-infected silver catfish (Fig. 3C) ($P < 0.05$).

3.4 Glutathione redox status, glutathione synthesis and thiol-protein mixed disulfides

A. hydrophila induces GSH depletion (Fig. 4A) ($P < 0.05$) and a rise in the levels of its oxidized form, GSSG (Fig. 4B) ($P < 0.05$), thus increasing the ratio of GSSG to GSH, an indicative of oxidative stress (Fig. 4C) ($P < 0.05$). It also triggers a decrease in GR activity (Fig. 4D) ($P < 0.05$), a rise in PSSX content (Fig. 4E) ($P < 0.05$) and a reduction in PSH levels (Fig. 4F) ($P < 0.05$). Furthermore, *A. hydrophila* leads to a decrease in cysteine (Fig. 5A) ($P < 0.05$) and GCLc contents in muscle of silver catfish (Fig. 5B) ($P < 0.05$). The dietary addition of rutin does not recover GSH (Fig. 4A) ($P < 0.05$), cysteine (Fig. 5A) ($P < 0.05$) and GCLc levels (Fig. 5B) ($P < 0.05$); however, it markedly augments GR activity to values higher than control (Fig. 4D) ($P < 0.05$). Rutin-added diet diminishes GSSG (Fig. 4B) ($P < 0.05$) and, thus, the ratio of GSSG to GSH; nevertheless, although decreased, this GSSG to GSH ratio is still higher than that of the control (Fig. 4C) ($P < 0.05$). It also reduces PSSX content (Fig. 4E) ($P < 0.05$) and increases PSH levels in muscle of *A. hydrophila*-challenged silver catfish (Fig. 4F) ($P < 0.05$).

3.5 Lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidant responses

A. hydrophila increases lipid peroxidation content, measured as LOOH (Fig. 6A) ($P < 0.05$) and TBARS (Fig. 6B) ($P < 0.05$). Moreover, it also induces a decrease in AA (Fig. 6C) ($P < 0.05$) and TAC levels in muscle of silver catfish (Fig. 6D) ($P < 0.05$). The dietary addition of rutin reduces LOOH (Fig. 6A) ($P < 0.05$) and TBARS content (Fig. 6B) ($P < 0.05$) as well as markedly elevates AA (Fig. 6C) ($P < 0.05$) and reestablishes TAC levels (Fig. 6D) ($P < 0.05$). Furthermore, as illustrated in Table 2, it rises AA to TAC ratio in muscle of silver catfish.

4 Discussion

Previous studies from our research group reported that the dietary addition of flavonoids as rutin [23] and also quercetin is important for stimulating the antioxidative responses in brain, gill, liver, kidney and muscle of silver catfish [21]. Our group also exhibited that the dietary addition of quercetin plays an essential role in protecting muscle against oxytetracycline-induced oxidative stress, being useful in minimizing the adverse effects in fish requiring treatment with this antibiotic [22]. Now, the current investigation reveals at the first time that the dietary addition of rutin at 0.15% improves the inflammation, apoptosis and antioxidative responses in muscle of silver catfish challenged with *A. hydrophila*. Furthermore, muscle was chosen as a target of this research since it was recognized as is an important focus of immune reactions in fish during pathogen infection. In addition to the classical immune tissues that are involved in the innate immunity (including head kidney, spleen and skin), muscle, which makes up more than 50% of total body mass of fish, produces several immune-response factors, as recently reported by Valenzuela et al. [42].

The histological analysis used in this investigation demonstrated that *A. hydrophila* triggers the infiltration of inflammatory cells and hemorrhage in muscle of silver catfish. Inflammatory infiltration was also observed in gill, liver, head kidney and spleen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [15] and mandarin fish (*Siniperca chatsi*) infected with *A. hydrophila* due to a strong up-regulation of *tnf- α* and *il-8* gene expression [17]. Indeed, it was shown that pro-inflammatory cytokines are involved in the innate immune responses, inflammation and apoptosis during *A. hydrophila* infection in fish [10–12]. Furthermore, areas of hemorrhage were seen in muscle, head kidney, spleen of channel catfish [14] and liver of *A. hydrophila*-challenged grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [16]. All changes observed in the present research are abrogated by dietary addition of rutin, suggesting that it exerts an anti-inflammatory effect. Zheng et al. [24] described that the mechanism by which rutin regulates the anti-inflammatory response in liver of tilapia (*Oreochromis niloticus*) involves the regulation of the innate system through the inhibition of pro-inflammatory genes as *tnf- α* , *il-1 β* and *il-8* and also the induction of anti-inflammatory genes including *il-10* and *ifn- γ* .

Besides demonstrating the presence of inflammatory infiltrate by histology, the current research also shows that MPO activity, a marker of inflammatory infiltration, is elevated in muscle of silver catfish after *A. hydrophila* challenge. Accordingly, Das et al. [13] exhibited an

increase in MPO activity and O_2^{\bullet} production in *A. hydrophila*-infected olive barb (*Puntius sarana*), being proposed that both changes result from the initial inflammatory response to protect fish from the bacteria damage. Furthermore, it was reported that the antimicrobial mechanism of defense of fish relies upon the production of O_2^{\bullet} and other bactericidal agents, as MPO.

In addition to the increase of O_2^{\bullet} production, this investigation also noticed that NO levels are raised in muscle of silver catfish after *A. hydrophila* challenge. Banerjee et al. [18] established that NADPH oxidase mediates the O_2^{\bullet} generation during *A. hydrophila*-induced apoptosis in head kidney macrophages of walking catfish (*Clarias batrachus*). It was coupled with NF- κ B activation. Moreover, these authors described that O_2^{\bullet} modulates inducible nitric oxide synthase-induced NO production via NF- κ B, causing mitochondrial dysfunction, caspase activation and apoptosis. The present research observed that *A. hydrophila* challenge also induces apoptosis in muscle of silver catfish, suggesting that it can be caused through the formation of O_2^{\bullet} (in combination with the decrease in SOD activity), and, consequently, NO. Such changes are abolished by dietary addition of rutin. Accordingly, Chung et al. [43] described that polyphenols as caffeic acid and also Trolox protect gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from NO-induced apoptosis *in vitro*.

Apoptosis was evidenced in this study through Western blotting analysis. It shows that Akt phosphorylation is suppressed, Bax is induced and Bcl-2 is inhibited in muscle of silver catfish after *A. hydrophila* challenge. Brumatti et al. [44] exhibited that apoptosis is initiated through direct activation of Bax and neutralization of anti-apoptotic Bcl-2. Such proteins act as central regulators of apoptosis through promoting or blocking changes in mitochondrial permeability and the consequent release of pro-apoptotic factors and activation of caspases. Accordingly, it has been shown that *A. hydrophila* induces apoptosis in head kidney, spleen and skin of grass carp via mitochondrial pathway: induction of Bax and suppression of Bcl-2 [10,11]. It was inhibited by the addition of a methionine analogue [10] and AA in the diets [11] for 8 and 10 weeks, respectively.

The current research also showed that the dietary addition of rutin promotes cell survival and represses *A. hydrophila*-induced apoptosis in muscle of silver catfish, since it induces Akt phosphorylation, inhibits Bax and upregulates Bcl-2. The anti-apoptotic action of rutin was established through *in vivo* model of myocardial ischemia-reperfusion-induced apoptosis in rats [45] and *in vitro* models of H_2O_2 -induced apoptosis in H9C2 [45] and Leydig cells [46], where

such compound inhibits apoptosis through reducing Bax to Bcl-2 ratio and active caspase-3 expression. Rutin also promotes cell survival, through the activation of the PKB/Akt signal pathway, abrogating the decrease in the levels of phospho-Akt induced by H₂O₂ in both *in vitro* models [45,46]. The PKB/Akt pathway plays an essential role in inhibiting cell apoptosis and promoting survival. Akt, once activated, is able to phosphorylate different molecules that contribute to the suppression of apoptosis. It can phosphorylate and inactivate Bad (a protein that binds and inhibits Bcl-2 function) [44].

Apoptosis has been linked to glutathione oxidation [47]. The present investigation demonstrated that *A. hydrophila* challenge causes GSH depletion in muscle of silver catfish. Accordingly, various studies found that the reduction of GSH levels in immune organs is a concern in *A. hydrophila*-infected grass carp. However, these authors did not determine either GSH redox status or GSH production [10–12]. GSH is produced from its constituent amino acids (glutamate, cysteine and glycine) forming a tripeptide thiol. Such synthesis requires two steps: the first is catalyzed by GCL and the second is mediated by GSH synthetase. The activity of GCL, a rate-limiting enzyme, and the availability of cysteine play a key role for GSH formation [48]. So, for the first time, current research indicated that a reason that can explain the depletion of GSH levels is the impairment in its synthesis, since it is observed a diminution in the cysteine levels and an inhibition in GCLc expression in muscle of *A. hydrophila*-challenged silver catfish. Pan et al. [10] just hinted that this might be happening, since they exhibited that a diet deficient in methionine, a precursor of cysteine, causes GSH depletion in head kidney and spleen of *A. hydrophila*-infected grass carp.

For the first time as well, the present study reported that the other reason for GSH depletion during *A. hydrophila* challenge is the oxidation of GSH to GSSG, increasing the ratio of GSSG to GSH in muscle of silver catfish, leading to oxidative stress, which is well known for limiting immune responses in fish [10–12]. As Sies et al. [47], the augmented GSSG to GSH ratio also reflects changes in redox signaling. Accordingly, Lu [48] described that during oxidative stress, cysteine residues in proteins can be oxidized to sulfenic acid and react with GSH to form protein mixed disulfides including S-glutathionylation. This reversible post-translational modification has a great importance in redox regulation and can activate or inactivate protein function [35,49]. The present investigation, using a spectrophotometric technique, evidenced for the first time that *A. hydrophila* diminishes the concentration of cysteine residues of proteins, which can be oxidized and are found engaged in thiol-protein mixed disulfides, whose levels are raised in the muscle of silver catfish. Mixed disulfides act

as a biological redox switch in the regulation of signal transduction and metabolic pathways [50]. It was shown, for example, that S-glutathionylation leads to endothelial nitric oxide synthetase uncoupling, induces oxidative stress and $O_2^{\bullet-}$ anion production, promoting a pro-oxidant response in aortic rings from rats [51]. Therefore, we consider that in a future work will be important to recognize the protein targets that suffer this post-translational modification to assess the impact of this change during *A. hydrophila* infection.

Besides GSH, other non-enzymatic antioxidants include polyphenols, uric acid, α -tocopherol and AA [47]. TAC is a method that permits to estimate the power of total non-enzymatic antioxidants to counteract oxidative stress-induced cell damage [52]. α -Tocopherol is a chain-breaking antioxidant in lipid peroxidation, generating α -tocopheroxyl [47]. The reconversion of such radical to α -tocopherol forms dehydroascorbic acid, the oxidized form of AA, which is reduced through the action of GSH [49]. The current research revealed that in addition to GSH depletion, *A. hydrophila* also triggers a decrease in AA levels and, consequently, TAC indexes in muscle of silver catfish. It also induces oxidative damage to lipids, which is evidenced through increased levels of LOOH and TBARS, initial and final products of lipid peroxidation, respectively. Accordingly, lipid peroxidation and GSH depletion were also detected in liver and immune tissues of *A. hydrophila*-challenged grass carp fed with diets deficient in GSH [9], AA [11] and α -tocopherol [12].

The present study reported that the dietary addition of rutin diminishes oxidative stress, since it decreases GSSG to GSH ratio and mixed disulfides formation through decreasing GSSG accumulation via GR activity in muscle of *A. hydrophila*-infected silver catfish. GR, an enzyme that recycles GSSG to GSH, is found elevated in muscle of *A. hydrophila*-challenged silver catfish fed with rutin-added diet; however, it does not seem to be enough to enhance GSH levels. A mechanism that can explain such effect is that the dietary addition of rutin does not stimulate GSH synthesis, which remains impaired in muscle of *A. hydrophila*-challenged silver catfish. Nevertheless, the current investigation showed that the dietary addition of rutin impedes lipid peroxidation and AA loss in muscle of *A. hydrophila*-infected silver catfish, attributing the reestablishment of membrane integrity and also the restoration of TAC indexes to the rise of the AA levels, as seen through the increase in the AA to TAC ratio. Xu et al. [11] described the central role of AA for antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic responses in fish. These authors showed that an AA-added diet avoids oxidative stress, inflammation and apoptosis in immune tissues of *A. hydrophila*-challenged grass carp. Furthermore, a research

from our group demonstrated that dietary addition of rutin for 3 weeks diminishes lipid peroxidation and elevates AA content in brain, gill, liver, kidney and muscle of silver catfish by about 100%, thus enhancing TAC [23]. The interaction between rutin and AA was described in previous studies. For example, as Clemetson and Andersen et al. [53], rutin and quercetin possess potent antioxidant potential towards AA, decreasing its oxidation *in vitro*. Furthermore, it was shown that rutin potentiates the antilipoperoxidant effect of AA in human erythrocytes [54] and channel catfish fillet [28].

Therefore, in conclusion, the dietary addition of rutin at 0.15% improves the *A. hydrophila*-induced inflammation through reducing hemorrhage and inflammatory infiltrate levels. It also inhibits *A. hydrophila*-induced apoptosis by decreasing NO and O₂^{•-} levels, the species that trigger this process; activating PKB/Akt pathway; and diminishing Bax to Bcl-2 ratio, so promoting cell survival. Finally, it reduces the *A. hydrophila*-induced oxidative stress, since it decreases the GSSG to GSH ratio and mixed disulfides formation. It also stimulates the antioxidative responses, increasing AA levels, and, subsequently, TAC, thus reducing the oxidative damage to the lipids of the muscle of *A. hydrophila*-challenged silver catfish.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil, for kindly allow them to use the ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad, Hercules, USA). The authors also would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) and to the Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

References

- [1] G.K. Iwama, Stress in Fish, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851 (1998) 304–310. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x.
- [2] A.E. Ellis, Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria, *Dev. Comp. Immunol.* 25 (2001) 827–839.
- [3] R. Harikrishnan, C. Balasundaram, Modern Trends in *Aeromonas hydrophila* Disease Management with Fish, *Rev. Fish. Sci.* 13 (2005) 281–320. doi:10.1080/10641260500320845.
- [4] F.J. Sutili, L.T. Gressler, A.C. Vargas, C.C. Zeppenfeld, B. Baldisserotto, M.A. Cunha, The use of nitazoxanide against the pathogens *Ichthyophthirius multifiliis* and *Aeromonas hydrophila* in silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Vet. Parasitol.* 197 (2013) 522–526. doi:10.1016/j.vetpar.2013.06.012.
- [5] F.J. Sutili, L.C. Kreutz, M. Noro, L.T. Gressler, B.M. Heinzmann, A.C. de Vargas, B. Baldisserotto, The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Vet. Immunol. Immunopathol.* 157 (2014) 142–148. doi:10.1016/j.vetimm.2013.11.009.
- [6] F.J. Sutili, L. de L. Silva, L.T. Gressler, L.T. Gressler, E.K. Battisti, B.M. Heinzmann, A.C. de Vargas, B. Baldisserotto, Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: in vitro activity and their use in experimentally infected fish, *J. Appl. Microbiol.* 119 (2015) 47–54. doi:10.1111/jam.12812.
- [7] F.J. Sutili, A.L. Murari, L.L. Silva, L.T. Gressler, B.M. Heinzmann, A.C. de Vargas, D. Schmidt, B. Baldisserotto, The use of *Ocimum americanum* essential oil against the pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus sp.* in silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Lett. Appl. Microbiol.* 63 (2016) 82–88. doi:10.1111/lam.12602.
- [8] W.-H. Chu, C.-P. Lu, In vivo fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker, *Aquaculture.* 277 (2008) 152–155. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.03.009.
- [9] J.-H. Ming, J.-Y. Ye, Y.-X. Zhang, P. Xu, J. Xie, Effects of dietary reduced glutathione on growth performance, non-specific immunity, antioxidant capacity and expression levels of IGF-I and HSP70 mRNA of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Aquaculture.* 438 (2015) 39–46. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.12.038.
- [10] F.-Y. Pan, L. Feng, W.-D. Jiang, J. Jiang, P. Wu, S.-Y. Kuang, L. Tang, W.-N. Tang, Y.-A. Zhang, X.-Q. Zhou, Y. Liu, Methionine hydroxy analogue enhanced fish immunity via modulation of NF- κ B, TOR, MLCK, MAPKs and Nrf2 signaling in young grass carp

- (*Ctenopharyngodon idella*), Fish Shellfish Immunol. 56 (2016) 208–228. doi:10.1016/j.fsi.2016.07.020.
- [11] H.-J. Xu, W.-D. Jiang, L. Feng, Y. Liu, P. Wu, J. Jiang, S.-Y. Kuang, L. Tang, W.-N. Tang, Y.-A. Zhang, X.-Q. Zhou, Dietary vitamin C deficiency depresses the growth, head kidney and spleen immunity and structural integrity by regulating NF- κ B, TOR, Nrf2, apoptosis and MLCK signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), Fish Shellfish Immunol. 52 (2016) 111–138. doi:10.1016/j.fsi.2016.02.033.
- [12] J.-H. Pan, L. Feng, W.-D. Jiang, P. Wu, S.-Y. Kuang, L. Tang, Y.-A. Zhang, X.-Q. Zhou, Y. Liu, Vitamin E deficiency depressed fish growth, disease resistance, and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Referring to NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling, Fish Shellfish Immunol. 60 (2017) 219–236. doi:10.1016/j.fsi.2016.11.044.
- [13] A. Das, P.K. Sahoo, B.R. Mohanty, J.K. Jena, Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors, Vet. Immunol. Immunopathol. 142 (2011) 207–218. doi:10.1016/j.vetimm.2011.05.017.
- [14] C.R. Rasmussen-Ivey, M.J. Hossain, S.E. Odom, J.S. Terhune, W.G. Hemstreet, C.A. Shoemaker, D. Zhang, D.-H. Xu, M.J. Griffin, Y.-J. Liu, M.J. Figueras, S.R. Santos, J.C. Newton, M.R. Liles, Classification of a Hypervirulent *Aeromonas hydrophila* Pathotype Responsible for Epidemic Outbreaks in Warm-Water Fishes, Front. Microbiol. 7 (2016) 1615. doi:10.3389/fmicb.2016.01615.
- [15] H. Abdelhamed, I. Ibrahim, W. Baumgartner, M.L. Lawrence, A. Karsi, Characterization of Histopathological and Ultrastructural Changes in Channel Catfish Experimentally Infected with Virulent *Aeromonas hydrophila*, Front. Microbiol. 8 (2017) 1519. doi:10.3389/fmicb.2017.01519.
- [16] S.-T. Wang, X.-Z. Meng, L.-S. Li, Y.-F. Dang, Y. Fang, Y. Shen, X.-Y. Xu, R.-Q. Wang, J.-L. Li, Biological parameters, immune enzymes, and histological alterations in the livers of grass carp infected with *Aeromonas hydrophila*, Fish Shellfish Immunol. 70 (2017) 121–128. doi:10.1016/j.fsi.2017.08.039.
- [17] N. Chen, J. Jiang, X. Gao, X. Li, Y. Zhang, X. Liu, H. Yang, X. Bing, X. Zhang, Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Aeromonas hydrophila*, Fish Shellfish Immunol. 83 (2018) 410–415. doi:10.1016/j.fsi.2018.09.023.

- [18] C. Banerjee, A. Singh, T.K. Das, R. Raman, A. Shrivastava, S. Mazumder, Ameliorating ER-stress attenuates *Aeromonas hydrophila*-induced mitochondrial dysfunctioning and caspase mediated HKM apoptosis in *Clarias batrachus*, *Sci. Rep.* 4 (2014) 5820. doi:10.1038/srep05820.
- [19] V. Kiron, Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care, *Anim. Feed Sci. Technol.* 173 (2012) 111–133. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015.
- [20] H.-X. Liu, X.-Q. Zhou, W.-D. Jiang, P. Wu, Y. Liu, Y.-Y. Zeng, J. Jiang, S.-Y. Kuang, L. Tang, L. Feng, Optimal α -lipoic acid strengthen immunity of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by enhancing immune function of head kidney, spleen and skin, *Fish Shellfish Immunol.* 80 (2018) 600–617. doi:10.1016/j.fsi.2018.06.057.
- [21] T.S. Pês, E.M.H. Saccol, G.M. Ourique, É.P. Londero, L.T. Gressler, J.I. Golombieski, W.G. Glanzner, S.F. Llesuy, P.B.D. Gonçalves, J.R. Neto, B. Baldisserotto, M.A. Pavanato, Quercetin in the diet of silver catfish: Effects on antioxidant status, blood parameters and pituitary hormone expression, *Aquaculture.* 458 (2016) 100–106. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.02.020.
- [22] T.S. Pês, E.M.H. Saccol, É.P. Londero, C.A. Bressan, G.M. Ourique, T.M. Rizzetti, O.D. Prestes, R. Zanella, B. Baldisserotto, M.A. Pavanato, Protective effect of quercetin against oxidative stress induced by oxytetracycline in muscle of silver catfish, *Aquaculture.* 484 (2018) 120–125. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.10.043.
- [23] T.S. Pês, E.M.H. Saccol, G.M. Ourique, É.P. Londero, L.T. Gressler, I.A. Finamor, D.A. Rotili, J.I. Golombieski, W.G. Glanzner, S.F. Llesuy, P.B.D. Gonçalves, J. Radünz Neto, B. Baldisserotto, M.A. Pavanato, Effect of diets enriched with rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Fish Physiol. Biochem.* 42 (2016) 321–333. doi:10.1007/s10695-015-0140-z.
- [24] Y. Zheng, Z. Zhao, L. Fan, S. Meng, C. Song, L. Qiu, P. Xu, J. Chen, Dietary supplementation with rutin has pro-/anti-inflammatory effects in the liver of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Fish Shellfish Immunol.* 64 (2017) 49–55. doi:10.1016/j.fsi.2017.03.014.
- [25] T.-J. Hsieh, J.-C. Wang, C.-Y. Hu, C.-T. Li, C.-M. Kuo, S.-L. Hsieh, Effects of rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge, *Fish Shellfish Immunol.* 25 (2008) 581–588. doi:10.1016/j.fsi.2008.07.014.
- [26] R. China, S. Mukherjee, S. Sen, S. Bose, S. Datta, H. Koley, S. Ghosh, P. Dhar, Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic

- bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*, *Microbiol. Res.* 167 (2012) 500–506. doi:10.1016/j.micres.2012.04.003.
- [27] J.B. Harborne, Nature, distribution and function of plant flavonoids, *Prog. Clin. Biol. Res.* 213 (1986) 15–24.
- [28] S.C. Bai, D.M. Gatlin, Dietary rutin has limited synergistic effects on vitamin C nutrition of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Fish Physiol. Biochem.* 10 (1992) 183–188. doi:10.1007/BF00004512.
- [29] I. Lopez-Font, S. Gea-Sorlí, E. de-Madaria, L.M. Gutiérrez, M. Pérez-Mateo, D. Closa, Pancreatic and pulmonary mast cells activation during experimental acute pancreatitis, *World J. Gastroenterol.* 16 (2010) 3411–3417.
- [30] B. Pulli, M. Ali, R. Forghani, S. Schob, K.L.C. Hsieh, G. Wojtkiewicz, J.J. Linnoila, J.W. Chen, Measuring myeloperoxidase activity in biological samples, *PloS One.* 8 (2013) e67976. doi:10.1371/journal.pone.0067976.
- [31] H.D. Wang, P.J. Pagano, Y. Du, A.J. Cayatte, M.T. Quinn, P. Brecher, R.A. Cohen, Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide, *Circ. Res.* 82 (1998) 810–818.
- [32] J.E. Dominy, J. Hwang, M.H. Stipanuk, Overexpression of cysteine dioxygenase reduces intracellular cysteine and glutathione pools in HepG2/C3A cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293 (2007) E62–69. doi:10.1152/ajpendo.00053.2007.
- [33] M.K. Gaitonde, A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids, *Biochem. J.* 104 (1967) 627–633.
- [34] D. Giustarini, I. Dalle-Donne, A. Milzani, P. Fanti, R. Rossi, Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 1660–1669. doi:10.1038/nprot.2013.095.
- [35] R. Priora, L. Coppo, S. Salzano, P. Di Simplicio, P. Ghezzi, Measurement of mixed disulfides including glutathionylated proteins, *Methods Enzymol.* 473 (2010) 149–159. doi:10.1016/S0076-6879(10)73007-X.
- [36] M. Hermes-Lima, W.G. Willmore, K.B. Storey, Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 271–280.
- [37] J.H. Roe, C.A. Kuether, The Determination of Ascorbic Acid in Whole Blood and Urine Through the 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivative of Dehydroascorbic Acid, *J. Biol. Chem.* 147 (1943) 399–407.

- [38] D.L. Granger, N.M. Anstey, W.C. Miller, J.B. Weinberg, Measuring nitric oxide production in human clinical studies, *Methods Enzymol.* 301 (1999) 49–61.
- [39] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [40] I. Carlberg, B. Mannervik, Glutathione reductase, *Methods Enzymol.* 113 (1985) 484–490.
- [41] Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols - Campos - 1997 - International Journal of Chemical Kinetics - Wiley Online Library, (n.d.).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-4601%281997%2929%3A3%3C219%3A%3AAID-KIN9%3E3.0.CO%3B2-X> (accessed April 16, 2019).
- [42] C.A. Valenzuela, R. Zuloaga, M. Poblete-Morales, T. Vera-Tobar, L. Mercado, R. Avendaño-Herrera, J.A. Valdés, A. Molina, Fish skeletal muscle tissue is an important focus of immune reactions during pathogen infection, *Dev. Comp. Immunol.* 73 (2017) 1–9. doi:10.1016/j.dci.2017.03.004.
- [43] M.J. Chung, P.A. Walker, C. Hogstrand, Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and Trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis, *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 80 (2006) 321–328. doi:10.1016/j.aquatox.2006.09.009.
- [44] G. Brumatti, M. Salmanidis, P.G. Ekert, Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 67 (2010) 1619–1630. doi:10.1007/s00018-010-0288-8.
- [45] J.J. Jeong, Y.M. Ha, Y.C. Jin, E.J. Lee, J.S. Kim, H.J. Kim, H.G. Seo, J.H. Lee, S.S. Kang, Y.S. Kim, K.C. Chang, Rutin from *Lonicera japonica* inhibits myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis in vivo and protects H9c2 cells against hydrogen peroxide-mediated injury via ERK1/2 and PI3K/Akt signals in vitro, *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 47 (2009) 1569–1576. doi:10.1016/j.fct.2009.03.044.
- [46] J. Sun, H. Wang, B. Liu, W. Shi, J. Shi, Z. Zhang, J. Xing, Rutin attenuates H₂O₂-induced oxidation damage and apoptosis in Leydig cells by activating PI3K/Akt signal pathways, *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 88 (2017) 500–506. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.066.
- [47] H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones, Oxidative Stress, *Annu. Rev. Biochem.* 86 (2017) 715–748. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045037.

- [48] S.C. Lu, Glutathione synthesis, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- [49] C. Espinosa-Diez, V. Miguel, D. Mennerich, T. Kietzmann, P. Sánchez-Pérez, S. Cadenas, S. Lamas, Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress, *Redox Biol.* 6 (2015) 183–197. doi:10.1016/j.redox.2015.07.008.
- [50] A. Scirè, L. Cianfrugia, C. Minnelli, D. Bartolini, P. Torquato, G. Principato, F. Galli, T. Armeni, Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways, *BioFactors Oxf. Engl.* 45 (2019) 152–168. doi:10.1002/biof.1476.
- [51] C.-A. Chen, T.-Y. Wang, S. Varadharaj, L.A. Reyes, C. Hemann, M.A.H. Talukder, Y.-R. Chen, L.J. Druhan, J.L. Zweier, S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function, *Nature.* 468 (2010) 1115–1118. doi:10.1038/nature09599.
- [52] R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 997–1027. doi:10.1021/acs.jafc.5b04739.
- [53] C.A. Clemetson, L. Andersen, Plant polyphenols as antioxidants for ascorbic acid, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 136 (1966) 341–376.
- [54] A. Nègre-Salvayre, A. Affany, C. Hariton, R. Salvayre, Additional antilipoperoxidant activities of alpha-tocopherol and ascorbic acid on membrane-like systems are potentiated by rutin, *Pharmacology.* 42 (1991) 262–272. doi:10.1159/000138807.

Figure legends

Fig 1. Effects of rutin on inflammation in muscle of *A. hydrophila* infected-silver catfish.

Representative images of Goldner's trichromium histological staining in muscle sections of *A. hydrophila* infected-silver catfish fed with rutin-added diet. Hemorrhage (arrow) and inflammatory infiltrate (asterisk) are shown in *A. hydrophila*-infected silver catfish (A). Quantitative analysis of hemorrhage and inflammatory infiltrate found in muscle sections of fish belonging to the different experimental groups. The number of fishes per group was 4 (B). MPO activity in muscle homogenates of fish belonging to the different experimental groups. The number of fishes per group was 12 (C). Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: ^a*P* <0.05 versus control, ^b*P* <0.05 versus *A. hydrophila*, ^c*P* <0.05 versus rutin. Abbreviations: MPO, myeloperoxidase.

Fig 2. Effects of rutin on apoptosis in muscle of *A. hydrophila* infected-silver catfish.

Representative images of Western blotting of Bax and Bcl-2 and densitometry analysis of Bax to Bcl-2 ratio (A) phospho-Akt(Ser436) and Akt and densitometry analysis of the ratio of phospho-Akt(Ser436) to Akt (B) in muscle homogenates of *A. hydrophila* infected-silver catfish fed with rutin-added diet. Ponceau S staining was used as loading control. The number of fishes per group was 4. Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: ^a*P* <0.05 versus control, ^b*P* <0.05 versus *A. hydrophila*, ^c*P* <0.05 versus rutin.

Fig 3. Effects of rutin on apoptotic triggers in muscle of *A. hydrophila* infected-silver catfish.

NO (A), O₂^{•-} levels (B) and SOD activity (C) in muscle homogenates of *A. hydrophila* infected-silver catfish fed with rutin-added diet. The number of fishes per group was 12. Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: ^a*P* <0.05 versus control, ^b*P* <0.05 versus *A. hydrophila*. Abbreviations: NO, nitric oxide; O₂^{•-}, superoxide anion; SOD, superoxide dismutase.

Fig 4. Effects of rutin on glutathione redox status and thiol-protein mixed disulfide in muscle of

***A. hydrophila* infected-silver catfish.** GSH (A), GSSG levels (B), GSSG/GSH*1000 ratio (C), GR (D), PSSX (E) and PSH levels (F) in muscle homogenates of *A. hydrophila* infected-silver catfish fed with rutin-added diet. The number of fishes per group was 12. Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: ^a*P* <0.05 versus control, ^b*P* <0.05 versus *A. hydrophila*;

^c*P* <0.05 versus rutin. Abbreviations: GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GR, glutathione reductase; PSSX, thiol-protein mixed disulfides; PSH, cysteine residues of proteins.

Fig 5. Effects of rutin on glutathione synthesis in muscle of *A. hydrophila* infected-silver catfish. Cysteine levels in muscle homogenates of *A. hydrophila* infected-silver catfish fed with rutin-added diet. The number of fishes per group was 12 (A). Representative images of Western blotting of GCLc and its densitometry analysis in muscle homogenates of fish belonging to the different experimental groups. Ponceau S staining was used as loading control. The number of fishes per group was 4 (B). Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: ^a*P* <0.05 versus control, ^b*P* <0.05 versus *A. hydrophila*, ^c*P* <0.05 versus rutin. Abbreviations: GCLc, catalytic subunit of glutamate cysteine ligase.

Fig 6. Effects of rutin on lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidant responses in muscle of *A. hydrophila* infected-silver catfish. LOOH (A), TBARS (B), AA (C) and TAC levels (D) in muscle homogenates of *A. hydrophila* infected-silver catfish fed with rutin-added diet. The number of fishes per group was 12. Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: ^a*P* <0.05 versus control, ^b*P* <0.05 versus *A. hydrophila*; ^c*P* <0.05 versus rutin. Abbreviations: LOOH, lipid hydroperoxides; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; AA, ascorbic acid; TAC, total antioxidant capacity.

Fig. 1.

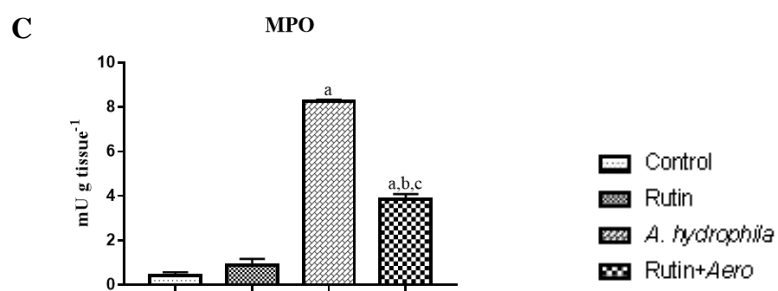
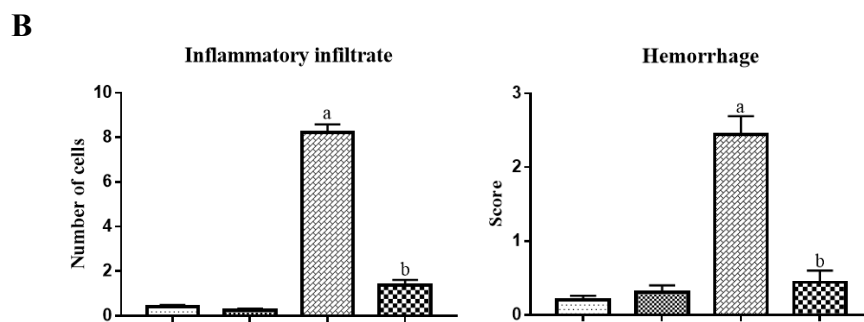
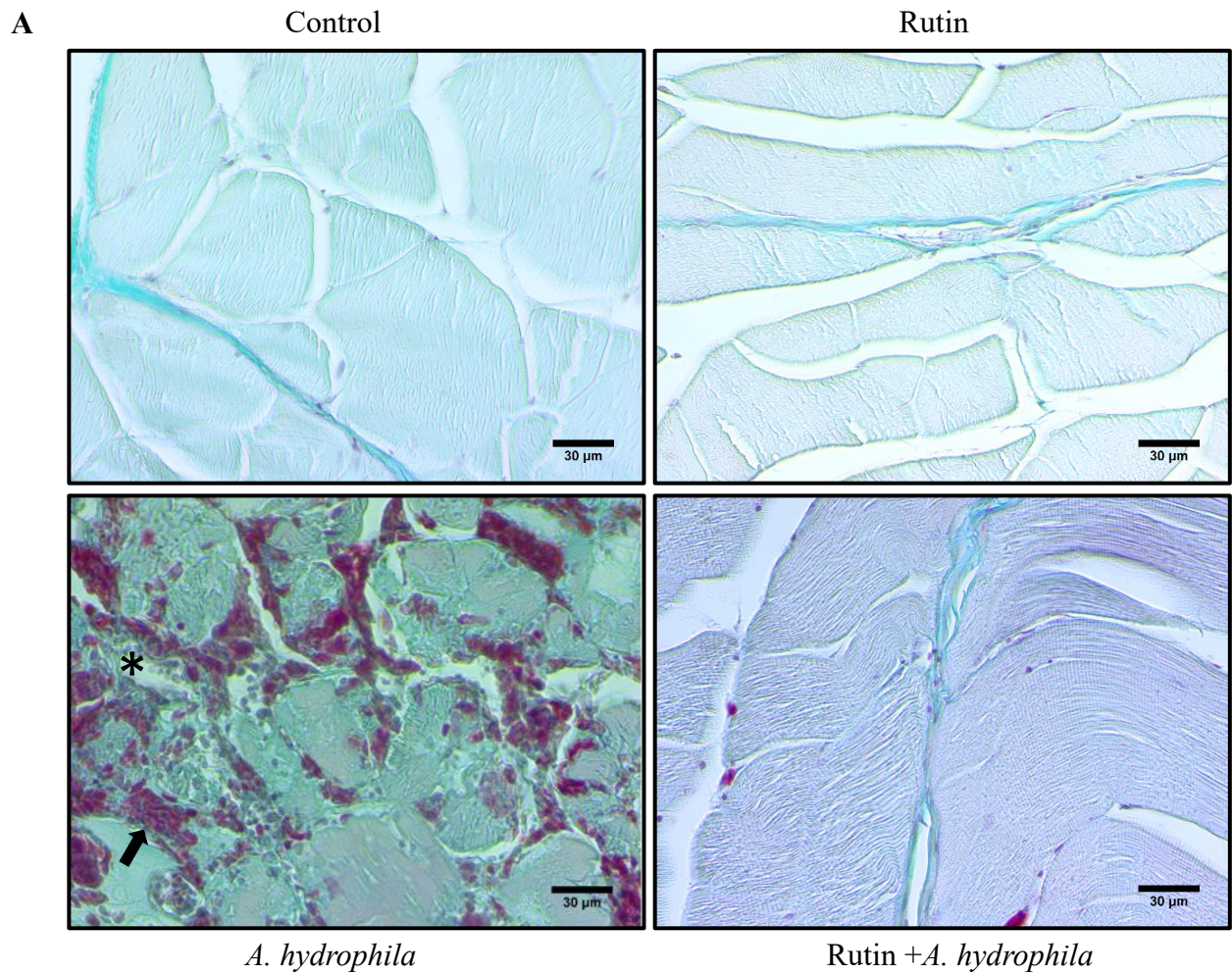


Fig 2.

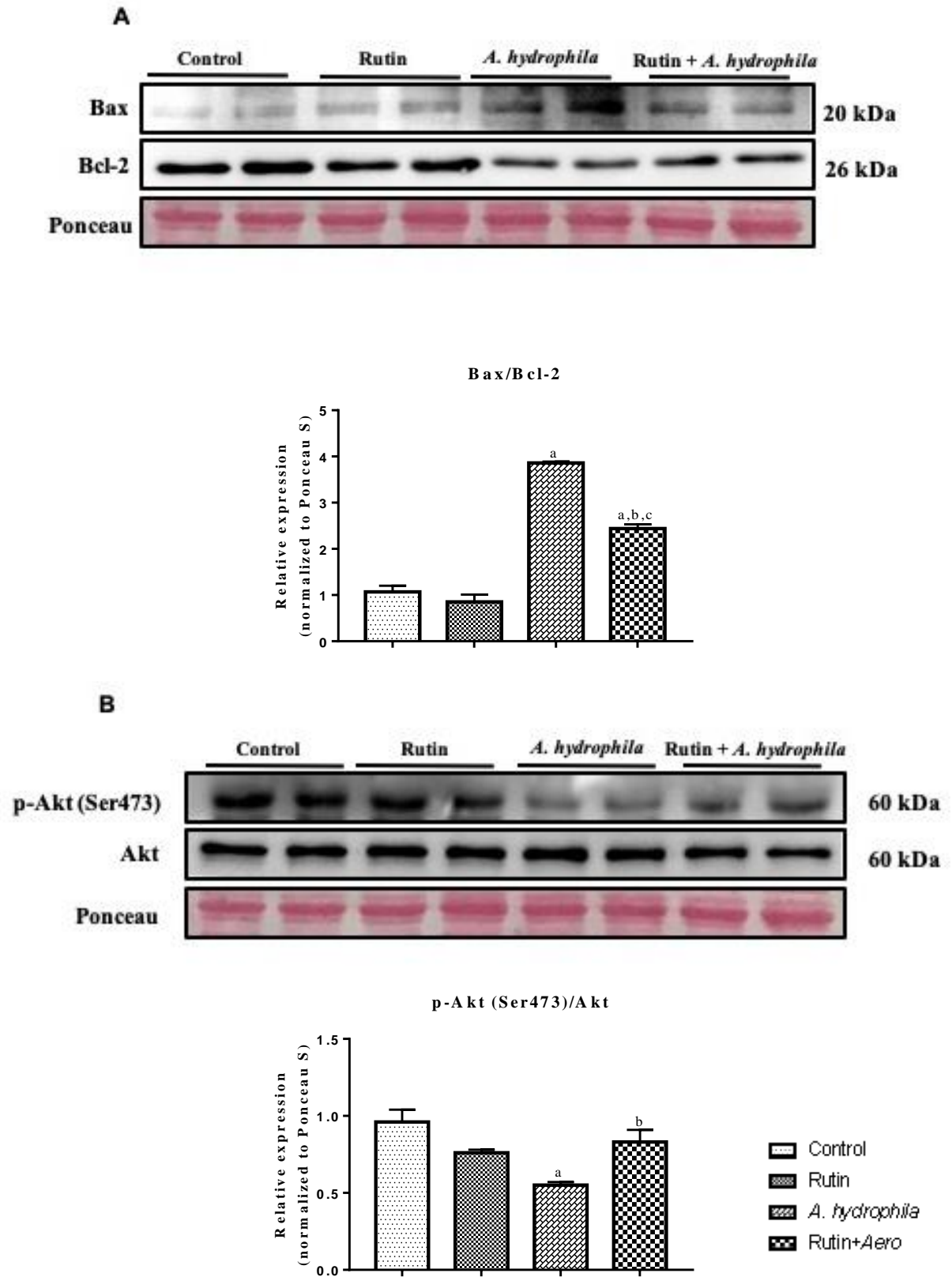


Fig 3.

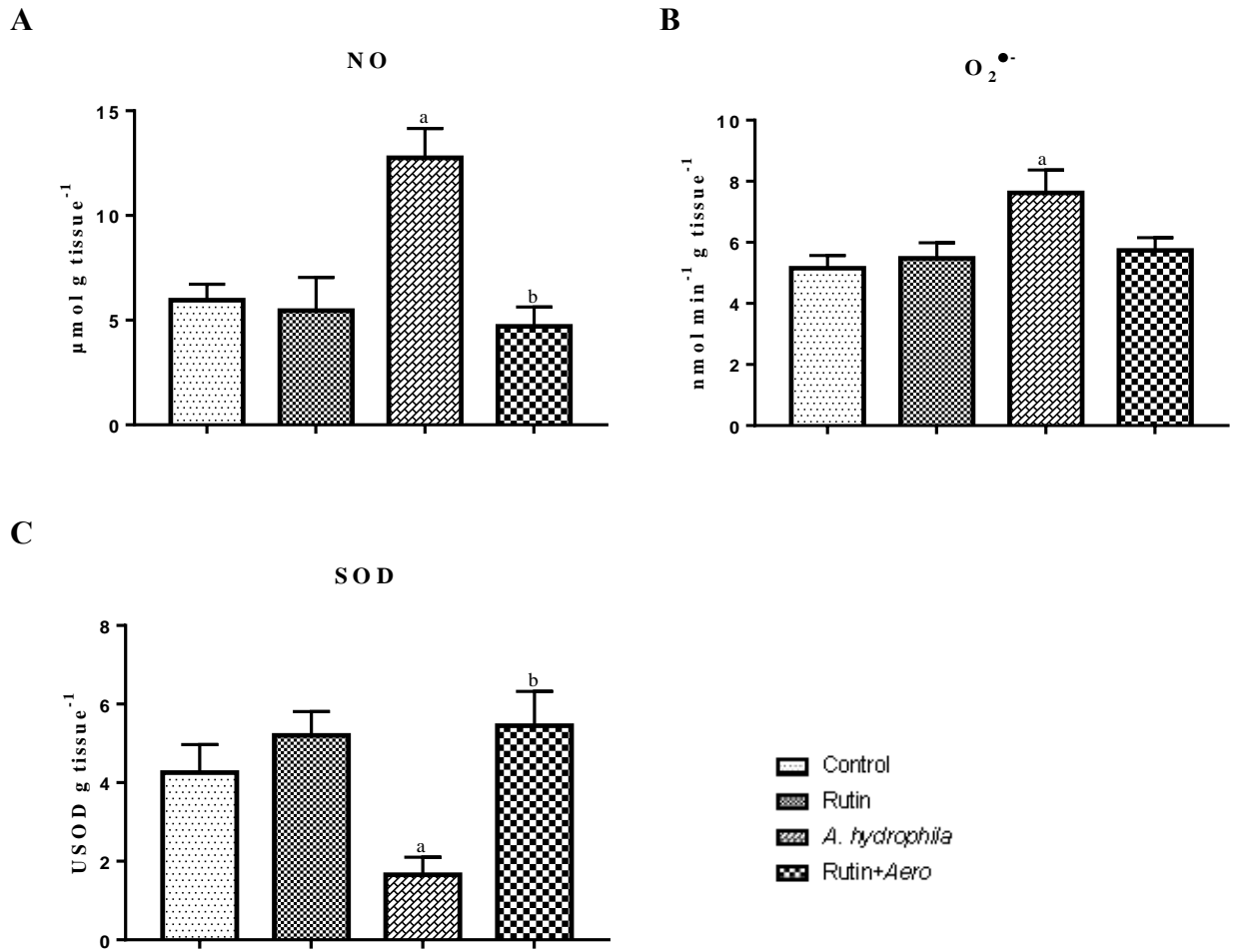


Fig 4.

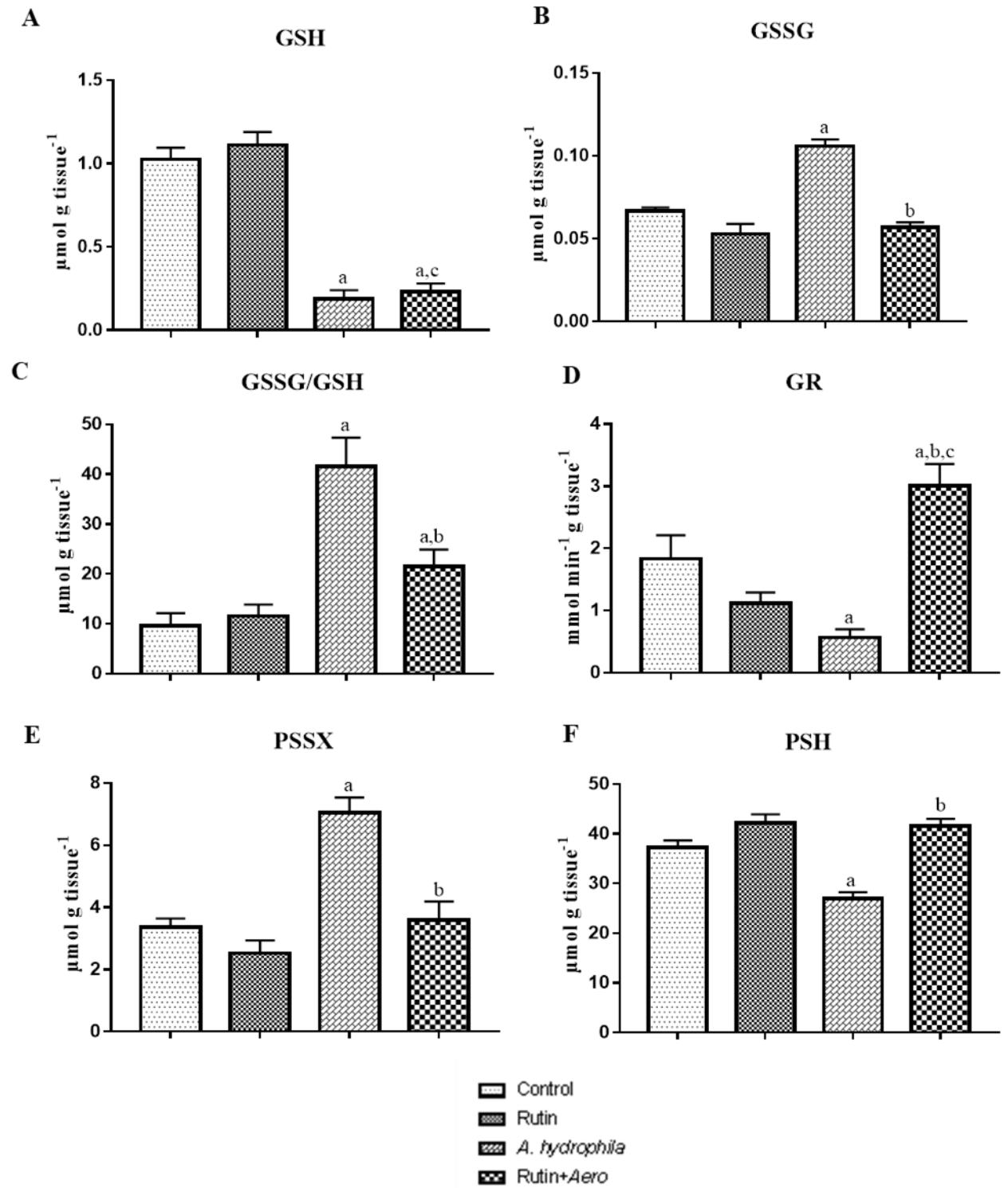
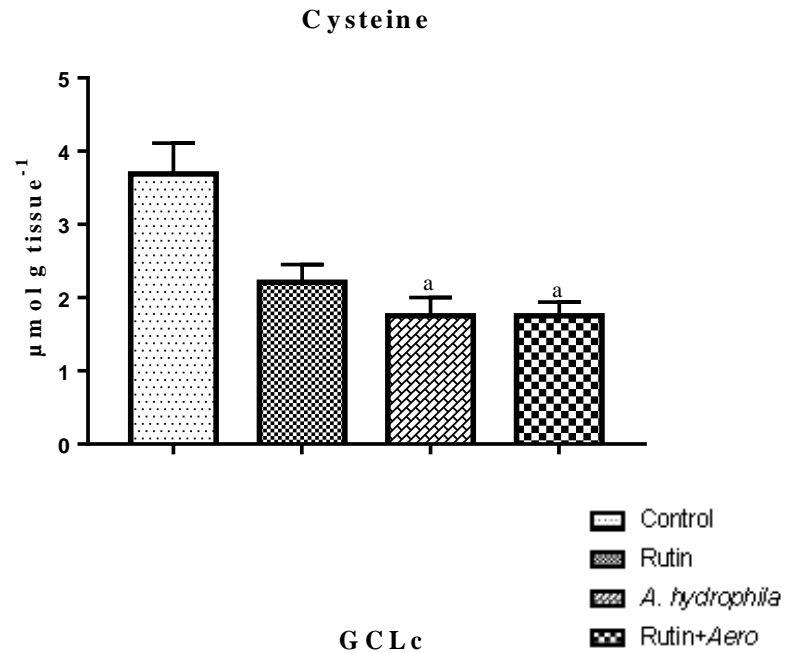


Fig 5.

A



B

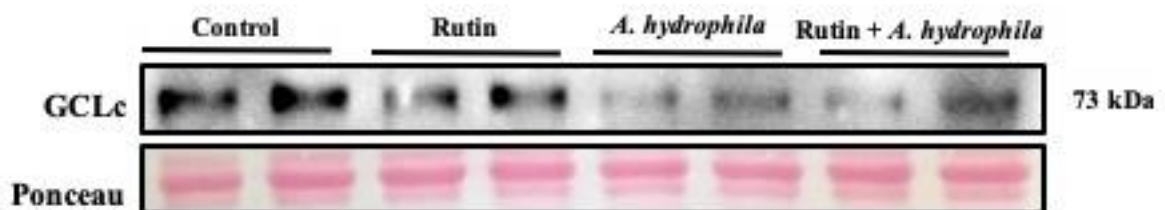
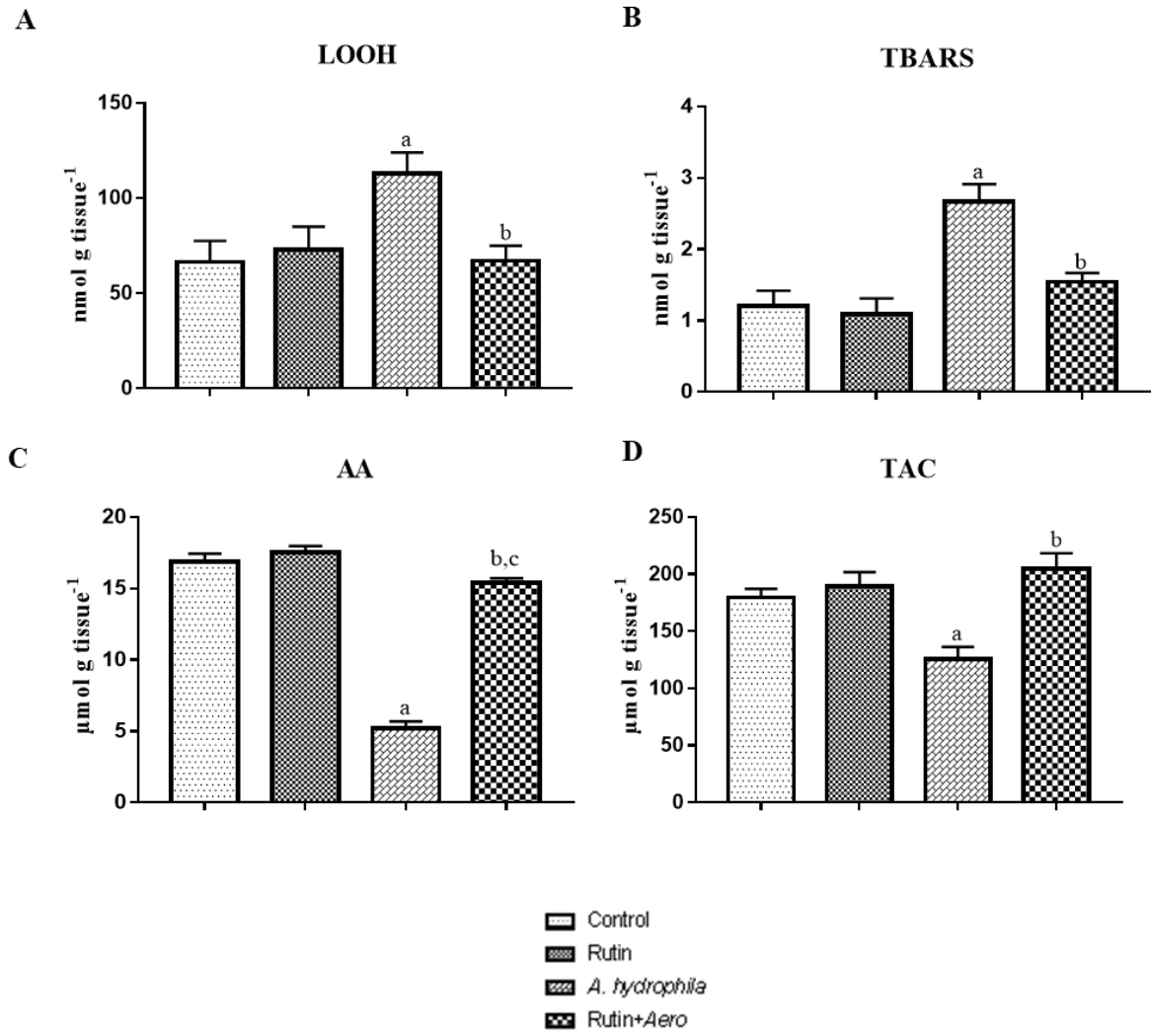


Fig 6.



Highlights

- Rutin improves *A. hydrophila*-induced inflammation in muscle of silver catfish.
- Rutin reduces *A. hydrophila*-induced apoptosis, promoting cell survival.
- Rutin decreases oxidized to reduced glutathione ratio in infected fish.
- Rutin is unable to recover glutathione synthesis in infected fish.
- Rutin improves *A. hydrophila*-induced damage and antioxidant responses.

Table 1. Formulation (%) of the experimental standard diet.

Ingredients	(%)
Meat and bone meal	35
Soybean meal	30
Corn	15
Rice bran	12
Canola oil	3
Salt	1
Phosphate dicalcium	1
Vitamins and minerals (premix)*	3

*Vitamin and mineral mixture (security levels per kilogram of product) – folic acid: 250 mg, pantothenic acid: 5000 mg, antioxidant: 600 mg, biotin: 125 mg, cobalt: 25 mg, copper: 2000 mg, iron: 820 mg, iodine: 100 mg, manganese: 3750 mg, niacin: 5000 mg, selenium: 75 mg, vitamin A: 1000000 UI, vitamin B1: 1250 mg, vitamin B12: 3750 mcg, vitamin B2: 2500 mg, vitamin B6: 2485 mg, vitamin C: 28000 mg, vitamin D3: 500000 UI, vitamin E: 20000 UI, vitamin K: 500 mg; zinc: 17500 mg.

Table 2. Effects of rutin on TAC index in muscle of *A. hydrophila* infected-silver catfish: its relationship with GSH and AA levels.

	Control	Rutin	<i>A. hydrophila</i>	Rutin+ <i>A. hydrophila</i>
GSH to TAC ratio	0.005	0.005	0.001	0.001
AA to TAC ratio	0.094	0.092	0.041	0.075

Abbreviations: GSH, reduced glutathione; AA, ascorbic acid; TAC, total antioxidant capacity.

5 CONCLUSÕES

A adição de rutina na dieta protegeu o músculo de jundiás infectados com *A. hydrophila*, uma vez que reduziu a inflamação e a apoptose. Além disso, embora esta dieta não tenha sido capaz de aumentar a síntese de GSH, ela atenuou o estresse oxidativo induzido por *A. hydrophila*, visto que diminuiu a razão GSSG/GSH e a formação de dissulfetos mistos, e estimulou a resposta antioxidante, reduzindo, assim, o dano oxidativo aos lipídios. Portanto, a adição da rutina na dieta dos peixes é uma opção economicamente viável e pode ser interessante a fim de preservar o músculo, um importante foco de reações imunes, durante situações desafiadoras. Visto que certas práticas comuns na aquicultura podem ocasionar o surgimento de doenças, as quais poderiam ser disseminadas para humanos através do consumo de filé de jundiá contaminado.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S. et al. Evaluating " anxiety" and social behavior in jundiá (*Rhamdia quelen*). **Physiology & Behavior**, v. 160, p. 59-65, June 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003193841630138X>>. Acesso em: 20 nov. 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.04.003.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, Jan. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900701006955>>. Acesso em: 20 abr. 2017. DOI: 10.1016/S0899-9007(01)00695-5.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15-24, Oct./Dec. 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715191/>>. Acesso em: 20 abr. 2017.
- ANTONENKOV, V. D. et al. Peroxisomes are oxidative organelles. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 4, p. 525-537, July 2010. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2009.2996>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1089/ars.2009.2996.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PESCA E AQUICULTURA. Rio de Janeiro: ACEB, v.1, 2014. 133p. Disponível em: <http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2017.
- AOKI, T. Motile aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P.T.K; BRUNO, D.W. (Ed). **Fish Diseases and Disorders**. Oxon: Cab International, 1999.
- ARAFÁ, E. S. A. et al. Tangeretin sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer cells through downregulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. **Cancer Research**, v. 69, n. 23, p. 8910-8917, Dec. 2009. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/23/8910.short>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 0.1158/0008-5472.CAN-09-1543.
- ARARUNA, M.K.A et al. Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 2, p. 252, Feb. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3336860/>>. Acesso em: 20 abr. 2017.
- ARJUMAND, W.; SETH, A.; SULTANA, S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFκB, TNF-α and caspase-3 expression in wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2013-2021, Sept. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511002018>>. Acesso em: 8 maio 2017. DOI: 10.1016/j.fct.2011.05.012.
- ASHKENAZI, A. et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 4, p. 273, Feb. 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209992>>. Acesso em: 3 jan. 2019. DOI: 10.1038/nrd.2016.253.

ATANASSOVA, M.; BAGDASSARIAN, V. Rutin content in plant products. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 44, n. 2, p. 201-203, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Valentina_Christova-Bagdassarian/publication/257076070_Rutin_content_in_plant_products/links/00b7d525bf507ab963000000.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2018.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006, 115 p.

AWAD, E.; AUSTIN, D.; LYNDON, A. R. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**, v. 388, p. 193-197, Apr. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848613000124>>. Acesso em: 19 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.008.

AZEVEDO, M. I. et al. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v. 9, n. 1, p. 53, Oct. 2013. Disponível em: <<https://molecularpain.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1744-8069-9-53>>. Acesso em: 6 jan. 2019. DOI: 10.1186/1744-8069-9-53.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 43, Aug. 2013. Disponível em: <<https://jdmonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/2251-6581-12-43>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1186/2251-6581-12-43.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, jan./fev. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000100051&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 15 abr. 2017. DOI: 10.1590/S0103-84782008005000046.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ-NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 383-394, Apr. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848603005453>>. Acesso em: 20 abr. 2017. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00545-3.

BARCELLOS, L. J. G. et al. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 355-363, 2008. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/34_3_355-363.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2017.

- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 583-600, May 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11370698>>. Acesso em: 8 jan. 2019. DOI: 10.1211/0022357011775910.
- BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, n. 4, p. 371-388, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfd.12025>>. Acesso em: 25 abr. 2017. DOI: 10.1111/jfd.12025.
- BERTOLETTO, P. R. et al. Oxidative stress gene expression profile in inbred mouse after ischemia/reperfusion small bowel injury. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 773-782, Nov. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502012001100006&script=sci_arttext>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1590/S0102-86502012001100006.
- BISWAS, S. K. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, Jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26881031>>. Acesso em: 8 jan. 2019. DOI: 10.1155/2016/5698931.
- BOIJINK, C.L.; BRANDÃO, D.A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v.31, n.4, p.687-690, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n4/a21v31n4>>. Acesso em: 15 abr. 2017.
- BRUMATTI, G.; SALMANIDIS, M.; EKERT, P. G. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 10, p. 1619-1630, May 2010. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-010-0288-8>> Acesso em: 5 abr. 2017. DOI: 10.1007/s00018-010-0288-8.
- CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, July 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16817922>>. Acesso em: 5 mar. 2017. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x.
- CARNEIRO, P.C.F; MIKOS, J. D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, jan./fev. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n1/a30v35n1.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2017. DOI: 10.1590/S0103-84782005000100030.
- CARRASCHI, S. P. et al. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 83, p. 115-120, Sept. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651312002096>>. Acesso em: 5 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.06.016.

CARVALHO GOMES, L. de. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v30n1/a29v30n1.pdf>>. Acesso em: 10 nov 2017.

CHENG, R. et al. Gingival fibroblasts resist apoptosis in response to oxidative stress in a model of periodontal diseases. **Cell Death Discovery**, v. 1, p. 15046, Nov. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/cddiscovery201546>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1038/cddiscovery.2015.46.

CHENG, C.H. et al. Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugus obscurus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 190-198, Apr. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651317308813?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.045.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805-817, Dec. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113007435>>. Acesso em: 18 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.jep.2013.10.036.

DENEV, S. et al. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. **International Aquatic Research**, v. 1, n. 1, p. 1-29, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/expphysiol.1997.sp004024/epdf>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. S1, p. S77-S112, Mar. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9849355>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1079/BJN19980106.

DOTTA, G. et al. Antioxidant enzymes, hematology and histology of spleen in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 79, p. 175-180, Aug. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S105046481830281X>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.05.024.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1737-1745, Feb. 2009. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rspb.2008.1791>>. Acesso em: 28 abr. 2017. DOI: 10.1098/rspb.2008.1791.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Pesca e aquicultura**. Palmas: Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/>>. Acesso em: 7 jan. 2019.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 884, n. 1, p. 19-40, 1999.

- EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. S2, p. S67-S74, May 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509092>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1049/BJN2000296.
- FANG, F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 12, p. 2818-2825, June 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC508130/>>. Acesso em: 15 abr. 2017. DOI: 10.1172/JCI119473.
- FENG, L. et al. Antioxidant status of serum, muscle, intestine and hepatopancreas for fish fed graded levels of biotin. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 499-510, Apr. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-013-9861-z>>. Acesso em: 9 dez. 2018. DOI: 10.1007/s10695-013-9861-z.
- FRANSEN, M. et al. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 9, p. 1363-1373, Sept. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443911002791>>. Acesso em: 21 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.12.001.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. Protective effect of rutin on humoral and cell mediated immunity in rat model. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 154-159, Aug. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279716304628>>. Acesso em 10 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.06.006.
- GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 305-312, Dec. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332217343421>>. Acesso em: 8 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.001.
- GIRAO, P. M.; PEREIRA DA SILVA, E. M.; DE MELO, M. P. Dietary lycopene supplementation on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles submitted to confinement: effects on cortisol level and antioxidant response. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 5, p. 789-798, June 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2109.2011.02890.x>>. Acesso em: 8 jan. 2019. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02890.x.
- GRASSMÉ, H.; JENDROSSEK, V.; GULBINS, E. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. **Apoptosis**, v. 6, n. 6, p. 441-445, Dec. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595833>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1023/A:1012485506972.
- GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. 1980. 99 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1980.
- GULLÓN, B. et al. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. **Trends in Food Science &**

Technology, v. 67, p. 220-235, Sept. 2017. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224416305842>>. Acesso em: 25 nov. 2018. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.07.008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^a ed., New York: Oxford University Press, 2007.

HAMID, N.H. et al. Studies on Pathogenicity Effect of *Aeromonas hydrophila* Infection in Juvenile Red Hybrid Tilapia *Oreochromis sp.* In: **Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology**. p. 532-539. 2017. Disponível em:
<<http://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/4894>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.14334/Proc.Intsem.LPVT-2016-p.532-539.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, Oct. 2002. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286302002085>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B. (ed). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p. 319-368. Disponível em:
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/047167558X.ch12>>. Acesso em: 6 abr. 2017. DOI: 10.1002/047167558X.ch12.

HOLIMAN, P.C.H; HERTOOG, M.G.L; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 43-46, Sept. 1996. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0308814696000659>>. Acesso em: 18 abr. 2017. DOI: 10.1016/0308-8146(96)00065-9.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, n. 8, p. 305-310, Sept. 1997. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332297880456>>. Acesso em: 5 abr. 2017. DOI: 10.1016/S0753-3322(97)88045-6.

HSIEH, T.J. et al. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 5, p. 581-588, 2008. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464808001629>>. Acesso em: 18 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.07.014.

IKWEGBUE, P. et al. Roles of heat shock proteins in apoptosis, oxidative stress, human inflammatory diseases, and cancer. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 2, Mar. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874698/>>. Acesso em: 8 jan. 2019. DOI: 10.3390/ph11010002.

JANBAZ, K.H.; SAEED, S.A.; GILANI, A.H. Protective effect of rutin on paracetamol-and CCl 4-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, n. 7, p. 557-563, Dec. 2002.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X02002174>>. Acesso em: 8 mai. 2017. DOI: 10.1016/S0367-326X(02)00217-4.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, Jan. 2010. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/cmcr/23/1/35.full.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2017. DOI: 10.1128/CMR.00039-09.

JAVED, H. et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, v. 210, p. 340-352, May 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452212001893>>. Acesso em: 8 maio 2017. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.02.046.

JONES, D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *In*: SIES, H.; PACKER, L. **Methods in Enzymology**. Academic Press, 2002. p. 93-112. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687902486302>>. Acesso em: 10 nov. 2018. DOI: 10.1016/S0076-6879(02)48630-2.

JONES; D.P. Defesas contra o estresse oxidativo. *In*: Ross, A.C. et al. (ed). **Nutrição moderna de Shills na saúde e na doença**. 11^a ed. Barueri: Manole, 2016.

KHAJEVAND-KHAZAEI, M. R. et al. Rutin, a quercetin glycoside, alleviates acute endotoxemic kidney injury in C57BL/6 mice via suppression of inflammation and up-regulation of antioxidants and SIRT1. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 307-313, Aug. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299918303510>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.06.019.

KHAN, R. A.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S. CCl₄-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 178, Oct. 2012. Disponível em: <<https://bmccomplementalmed.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1472-6882-12-178>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1186/1472-6882-12-178.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology**, v. 113, n. 4, p. 427-437, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2567.2004.01984.x>>. Acesso em: 20 nov. 2018. DOI: doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01984.x.

KREUTZ, L. C. et al. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 4, p. 694-697, Oct. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464810001750>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.06.003.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/259957595_Chemistry_and_Biological_Activities_of_Flavonoids_An_Overview>. Acesso em: 15 abr. 2017. DOI: 10.1155/2013/162750.

LEE, C.C. et al. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammatory injury. **Food & Function**, v. 4, n. 5, p. 794-802, Apr. 2013. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/-/content/articlelanding/2013/fo/c3fo30389f#!divAbstract>>. Acesso em: 18 abr. 2017. DOI: 10.1039/C3FO30389F.

LI, W. et al. 3, 4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 251-255, Oct. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927556>>. Acesso em: 20 abr. 2017. DOI: 10.1016/S0147-6513(02)00117-3.

LI, M. et al. Dietary flavonoids from *Allium mongolicum* Regel promotes growth, improves immune, antioxidant status, immune-related signaling molecules and disease resistance in juvenile northern snakehead fish (*Channa argus*). **Aquaculture**, v. 501, p. 473-481, Feb. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848618318659>>. Acesso em: 2 mar. 2019. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.12.011.

LIANG, X.P. et al. Effect of dietary vitamin C on the growth performance, antioxidant ability and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 1, p. 149-160, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/are.12869>>. Acesso em: 10 dez. 2018. DOI: 10.1111/are.12869.

LIMÓN-PACHECO, J; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1, p. 137-147, Mar. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571808002714>>. Acesso em: 15 mar. 2017. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015.

LIN, Y. H.; SHIAU, S.Y. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed high copper. **Aquaculture**, v. 267, n. 1-4, p. 38-43, July 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848606009124>>. Acesso em: 5 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.12.015.

LIAUDET, L.; SORIANO, F. G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 4, p. N37-N52, Apr. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807315>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3143-3153, May 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549305/>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.

LUCHINI, L.; AVENDAÑO, T. Primeros resultados de cultivo de un pez de aguas cálidas (*Rhamdia sapo*) con fines de producción y consumo humano. **Rev. Arg. Prod. Anim.**, v. 4, n. 5, p. 621-629, 1985. Disponível em: <[https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/especies/_archivos/000002-Catfish/071231_Primeros%20resultados%20de%20cultivo%20de%20un%20pez%20de%20aguas%20calidas%20\(Rhamdia%20sapo\)%20con%20fines%20de%20produccion%20y%20consumo%20humano.pdf](https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/especies/_archivos/000002-Catfish/071231_Primeros%20resultados%20de%20cultivo%20de%20un%20pez%20de%20aguas%20calidas%20(Rhamdia%20sapo)%20con%20fines%20de%20produccion%20y%20consumo%20humano.pdf)>. Acesso em: 5 jan. 2019.

LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 711-747, Apr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607273>>. Acesso em: 5 abr. 2017. DOI: 10.1007/s10695-015-0171-5.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, Dec. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231715000038>>. Acesso em: 20 nov. 2018. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 3, p. 283-289, July 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109649590600073X?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.cbpb.2006.02.014.

MARCARINI, J.C. **Estudo do flavonóide rutina na citotoxicidade e análise de biomarcadores gênicos e bioquímicos de estresse genotóxico e oxidativo em cultura de células**. 2013. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2013.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 1-2, p. 75-88, Feb. 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11160-005-7846-4>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1007/s11160-005-7846-4.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v.17, n.6, p.271-278, enero 2002. Disponível em: <<http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; LAMAS, S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. **Cardiovascular Research**, v. 62, n. 1, p. 43-52, Apr. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cardiavasces/article/62/1/43/372240>>. Acesso em: 15 mai. 2017. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.01.013

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, Dec. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121513>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

- MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, Feb. 2014. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/ars.2012.5149>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1089/ars.2012.5149.
- MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 221-234, July/Aug. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045606001992>>. Acesso em: 20 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.08.012.
- MORÓN-ALCAIN, E. et al. Effects of heat and cold shock-induced triploidy on productive parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) late-hatched in the reproductive season. **Aquaculture**, v. 473, p. 303-309, Apr. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848617303472>>. Acesso em: 25 nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.029>.
- NAZERI, S.; FARHANGI, M.; MODARRES, S. The effect of different dietary inclusion levels of rutin (a flavonoid) on some liver enzyme activities and oxidative stress indices in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) exposed to Oxytetracycline. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 8, p. 4356-4362, Mar. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/are.13257>>. Acesso em: 20 nov. 2018. DOI: 10.1111/are.13257.
- ORHAN, D. D. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 496-504, Aug. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501309000743>>. Acesso em: 7 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.micres.2009.09.002.
- OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p. 2181-2196, Sept. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593552>>. Acesso em: 7 jan. 2019. DOI: 10.1002/jps.20874.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237348>>. Acesso em: 10 abr. 2017. DOI: 10.1152/physrev.00029.2006.
- PAN, P.H. et al. Protective effects of rutin on liver injury induced by biliary obstruction in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 106-116, Aug. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158491400207X>>. Acesso em: 18 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.001.
- PAN, F.Y. et al. Methionine hydroxy analogue enhanced fish immunity via modulation of NF- κ B, TOR, MLCK, MAPKs and Nrf2 signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 208-228, Sept. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464816304429>>. Acesso em: 12 dez. 2018. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.07.020.

- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465813/>>. Acesso em: 12 abr. 2017. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
- PAVANATO, M.A.; LLESUY, S.F. Espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio. *In*: MARRONI, N, P. (org). **Estresse Oxidativo e Inflamação: dos Modelos Experimentais à Clínica**. 6ª ed. Canoas: ULBRA, 2008.
- PAVANELLI, G. C., EIRAS, J. C., TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2ª ed. Maringá: UEM, 2002.
- PEÑA-BLANCO, A.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 3, p. 416-431, July 2017. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.14186>>. Acesso em: 2 jan. 2019. DOI: 10.1111/febs.14186.
- PEREIRA, C. R. et al. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1057-1063, Nov. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151969842006000600013&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 25 nov. 2017. DOI: 10.1590/S1519-69842006000600013.
- PÊS, T. S. et al. Effect of diets enriched with rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 321-333, Feb. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-015-0140-z>>. Acesso em: 17 abr. 2017. DOI: 10.1007/s10695-015-0140-z.
- PIAIA, R. **Efeito do uso de diferentes fontes protéicas e diferentes níveis de proteína sobre o crescimento e sobrevivência de larvas do jundiá *Rhamdia quelen***. 1996. 47 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1996.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, May 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np9904509>>. Acesso em: 20 jan. 2019. DOI: 10.1021/np9904509.
- PIMENTEL, R. B. Q. et al. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 151, July 2013. Disponível em: <<https://bmccomplementalmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-13-151>>. Acesso em: 7 maio 2017. DOI: 10.1186/1472-6882-13-151.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, June 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415300039>>. Acesso em: 5 dez. 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

POHANKA, M. Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. **Folia Microbiológica**, v. 58, n. 6, p. 503-513, Nov. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504625>>. Acesso em: 19 dez. 2018. DOI: 10.1007/s12223-013-0239-5.

POURCEL, L. et al. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends In Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 29-36, Jan. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138506003141>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.11.006.

PRIORA, R. et al. Measurement of mixed disulfides including glutathionylated proteins. In: CADENA, E.; PACKER, L. (ed). **Methods in Enzymology**, v. 473: Academic Press, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007668791073007X>>. Acesso em: 5 jan. 2019. DOI: 10.1016/S0076-6879(10)73007-X.

RASMUSSEN-IVEY, C. R. et al. Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1615, Oct. 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01615/full>>. Acesso em: 6 jan. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01615.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0891584995022279>>. Acesso em: 12 abr. 2017. DOI: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.

RICE-EVANS C.; MILLER N.; PAGANGA G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, Apr. 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138597010182>>. Acesso em: 06 mar. 2017. DOI: 10.1016/S1360-1385(97)01018-2.

RINGUELET, R.; ARAMBURU, R.; ARAMBURU, A. **Los peces argentinos de agua dulce**. Buenos Aires: Librart, 1967.

RODRIGUES-GALDINO, A. M. et al. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**, v. 18, n. 2, p. 131-144, May 2009. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/development-of-the-neotropical-catfish-rhamdia-quelen-siluriformes-heptapteridae-incubated-in-different-temperature-regimes/C030C8BB2336B952BE9F83CC3505C1EB>>. Acesso em: 21 set. 2018. DOI: 10.1017/S096719940999013X.

RODRIGUEZ-MATEOS, A. et al. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 10, p. 1803-1853, Oct. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00204-014-1330-7>>. Acesso em: 07 fev. 2017. DOI: 10.1007/s00204-014-1330-7.

SACCOL, E.M.H. et al. Addition of *Lippia alba* (Mill) NE Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416, p. 244-254, Dec. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848613004948>>. Acesso em: 6 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.036.

SACCOL, E.M.H.; LLESUY, S.F; PAVANATO, M.A. Antioxidantes na aquicultura. *In*: BALDISSEROTTO, B. et al. (org). **Farmacologia aplicada à aquicultura**. Santa Maia, RS: UFSM, 2017.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M. M.; LIMA, M. R. Extratos vegetais como aditivos em rações para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 789-800, jan./fev. 2009. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/077V6N1P789_800_JAN2009_.pdf> . Acesso em: 20 out. 2016.

SCHLOTTFELDT, H.J.; ALDERMAN, D.J. **What should I do? A practical guide for the fresh water fish farmer**. Weymouth: Warwick press, 1995.

SEGNER, H. et al. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 85-105, Feb. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-011-9517-9>>. Acesso em: 06 mar. 2017. DOI: 10.1007/s10695-011-9517-9.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 82, n. 2, p. 291-295, Mar. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129943>>. Acesso em: 5 abr. 2017. DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 916-921, Nov. 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158499900177X?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00177-X.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180-183, Abr. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231715000038>>. Acesso em: 20 mar. 2017. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122-126, Feb. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468202017301407>>. Acesso em: 5 nov. 2018. DOI: 10.1016/j.cotox.2018.01.002

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715-748, Apr. 2017. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>>. Acesso em: 20 jan. 2018. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.

SILFVERGRIP, A. **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. Tese de Doutorado. Stockholm University, 1996.

TAKAHASHI, A.; OHNISHI, T. The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the Exposed Facility on the International Space Station. **Biological Sciences in Space**, v. 18, n. 4, p. 255-260, Dec. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858393>>. Acesso em: 8 dez. 2018. DOI: 10.2187/bss.18.255.

TATEISHI, N. et al. Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. **The Journal of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 93-103, Jan. 1974. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jb/article-abstract/75/1/93/1032710>>. Acesso em: 5 abr. 2017. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130387.

TKACHENKO, H. et al. Oxidative stress biomarkers in liver of sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) affected by ulcerative dermal necrosis syndrome. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, p. 391-402, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/274082909_Oxidative_Stress_Biomarkers_in_Liver_of_Sea_Trout_Salmo_trutta_mtrutta_L_affected_by_Ulcerative_Dermal_Necrosis_Syndrome>. Acesso em: 6 maio 2017. DOI: 10.4194/1303-2712-v14_2_09.

TOMÁS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN microbiology**, v. 2012, July 2012. Disponível: <<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/256261/>>. Acesso em: 20 mai. 2017. DOI: 10.5402/2012/256261.

TRENZADO, C. E. et al. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 440-447, Apr. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045608002974>>. Acesso em: 6 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.10.105.

VIJAYAVEL, K. et al. Dietary ascorbic acid and α -tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in the thornfish *Terapon jarbua*. **Science of the Total Environment**, v. 372, n. 1, p. 157-163, Dec. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969706007388?via%3Dihub>>. Acesso em: 6 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.09.027.

VILLANUEVA, C.; GIULIVI, C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 3, p. 307-316, Apr. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2900489/>>. Acesso em: 15 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004.

VULCANO, L. A. D.; SORACI, A. L.; TAPIA, M. O. Homeostasis del glutatión. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 47, n. 3, 2013. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/html/535/53529349007/>>. Acesso em: 9 fev. 2019.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 829-837, Apr. 2004. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584904000346>>. Acesso em: 6 abr. 2017. DOI: 0.1016/j.freeradbiomed.2004.01.002.

WEBSTER, R. P.; GAWDE, M. D.; BHATTACHARYA, R. K. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. **Cancer Letters**, v. 109, n. 1-2, p. 185-191, Dec. 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383596044436>>. Acesso em: 18 abr. 2017. DOI: 10.1016/S0304-3835(96)04443-6.

WELKER, A. F. et al. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 165, n. 4, p. 384-404, Aug. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643313000986?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 dez. 2018. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.04.003.

WIDLANSKY, M. E. et al. Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 4, p. 499-506, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584904009050>>. Acesso em: 25 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.013.

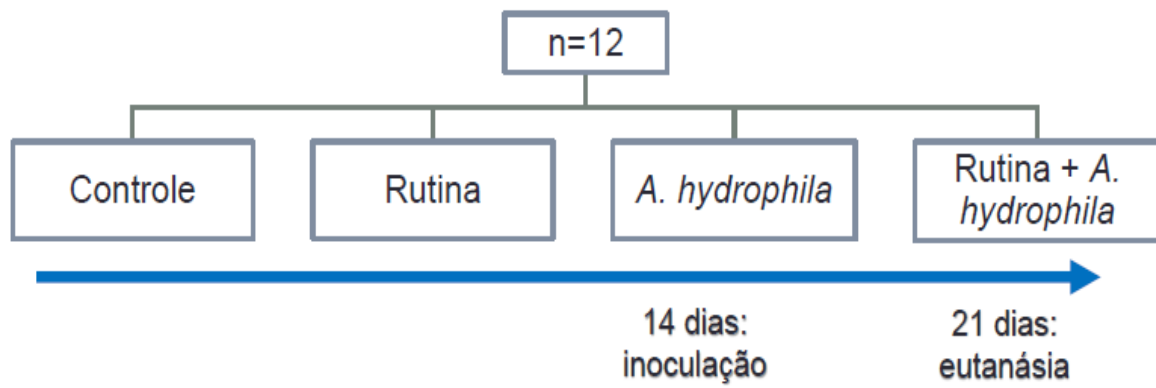
WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 549-561, Sept. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584908002803?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>.

WINTERBOURN, C. C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 164-170, Mar. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914004080>>. Acesso em: 20 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.017.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1060-1066, July 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643807002307>>. Acesso em: 25 abr. 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.06.010.

ZHANG, H. et al. Comparative proteomic analysis of hepatic mechanisms of *Megalobrama amblycephala* infected by *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 82, p. 339-349, Nov. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464818304728>>. Acesso em: 3 fev. 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.08.006.

ZHAO, J. et al. Effects of dietary isoleucine on the immune response, antioxidant status and gene expression in the head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 2, p. 572-580, Aug. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464813005925?via%3Dihub>>. Acesso em: 6 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.05.027.

ANEXO A – ESQUEMA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

ANEXO B – NÍVEIS DE HEMORRAGIA

