

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**

**Ricardo Yuji Sado**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ricardo Yuji Sado  
Médico Veterinário

**Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**

Orientador:

Prof. Dr. **JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba

2008

## Dedico

*Aos meus pais, **Kenji** e **Luiza**, que sempre me incentivaram e deram forças para continuar. Pelo grande exemplo de dedicação, seriedade, força, humildade e educação. Simplesmente as pessoas mais importantes da minha vida e responsáveis por todas as minhas conquistas e vitórias.*

*Aos meus amados irmãos, **Luciana** e **Heitor**, por fazerem parte da minha vida e sempre acreditarem em mim*

*À pequena **Letícia Aya**, por fazer de mim o “tio” mais feliz do mundo!*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino pela orientação, amizade e por acreditar no meu trabalho.

Aos técnicos Ismael Baldessin Junior e Sérgio Vanderlei Pena do Setor de Piscicultura-LZT/ESALQ pela ajuda e dicas de manejo durante a instalação dos experimentos.

À Dra. Fabiana Pilarski (Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos – Caunesp) pela amizade e ensinamentos de microbiologia e por disponibilizar as caps de *Aeromonas hydrophila*.

À Dra. Patricia Pauletti pela ajuda na coleta de material e análises histológicas, discussões, apoio e amizade.

Ao Dr. Ricardo Bertolla (Unifesp) por disponibilizar o equipamento para fotografia das lâminas de histologia e estensões sanguíneas.

À Maria Antônia “Tuca” (Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal) por disponibilizar os equipamentos para as análises hematológicas, companheirismo e amizade.

Aos Doutores Álvaro José de Almeida Bicudo e Anderson Ferreira pelos ensinamentos estatísticos, amizade e companheirismo nas horas alegres e difíceis.

Ao Dr. Marcílio Nichii pela ajuda e sugestões nas análises estatísticas e amizade.

Aos companheiros do Setor de Piscicultura Anderson Ferreira, Álvaro José de Almeida Bicudo, Daniel Padrão, Gustavo Sanches da Silva, Bruno da Silva Cerozzi, Fernando Sesso, Givanni Vitti Moro, Ricardo Borghesi e Jony Koji Dairiki.

Ao Guilherme, Sady e Celina pelas conversas e companhia.

Aos amigos Ana Paula Branco do Nascimento, Priscilla Villela, Naine Sangaletti, Erika Cavalcante, Tatiane Oldoni, Cleverson Oldoni, Aline Martins, Augusto Cesar Lima da Silva, Nilza Bicudo, Bruno Freitas de Conti (Mortão) e Kerli.

Aos amigos de sempre: Cururu, Snarf, Gump, Garibas, Marcilião.

Um agradecimento especial para Débora Yamane, que me acompanhou durante todo esse período me dando força e apoio sempre que precisei, tanto nos momentos felizes quanto nas horas mais difíceis. Muito obrigado por fazer parte da minha vida!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagem.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa e apoio logístico para realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente me ajudaram no decorrer do programa de doutoramento:

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Aqüicultura no Brasil .....	15
1.2 Aspectos da biologia e produção do pacu .....	16
1.4 Nutrição X Sanidade.....	17
1.5 Hematologia de peixes teleósteos.....	27
Referências .....	31
2 EFEITOS DA ADIÇÃO DE LEVAMISOL NA DIETA DO PACU <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG, 1887) SOBRE AS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E DE DESEMPENHO	44
Resumo .....	44
Abstract.....	44
2.1 Introdução.....	45
2.1 Desenvolvimento .....	46
2.1.1 Material e Métodos.....	46
2.1.2 Resultados.....	52
2.1.3 Discussão .....	60
2.2 Conclusão .....	67
Referências .....	67
3 EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA E NA DIETA DE JUVENIS DE PACU <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG, 1887) SOBRE OS PARÂMETROS DE DESEMPENHO E HEMATOLOGIA. ....	75
Resumo .....	75
Abstract.....	75
3.1 Introdução.....	76
3.2 Desenvolvimento .....	77
3.2.1 Material e Métodos.....	77
3.2.2 Resultados .....	84

3.2.3 Discussão .....	89
3.3 Conclusão .....	94
Referências .....	94
4 MANANOLIGOSSACARÍDEO NA DIETA DE JUVENIS DE PACU <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG 1887): ASPECTOS HEMATOLÓGICOS E DE DESEMPENHO. .....	100
Resumo .....	100
Abstract.....	100
4.1 Introdução.....	101
4.2 Desenvolvimento.....	102
4.2.1 Material e Métodos.....	102
4.2.2 Resultados .....	109
4.2.3 Discussão .....	116
4.3 Conclusão .....	124
Referências .....	124
ANEXOS .....	134



## RESUMO

### **Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**

O crescimento da produção aquícola e o aumento do consumo de peixe levam à intensificação dos sistemas de produção. Com a crescente conscientização da necessidade de adoção de técnicas adequadas para produção de alimento para consumo humano, torna-se necessário a adoção de Boas Práticas de Manejo (BPMs) em sistemas de produção aquícola. Uma destas práticas consiste na redução ou não utilização de antimicrobianos durante o ciclo de produção, através da utilização de substâncias imunoestimulantes. O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito de diferentes aditivos dietéticos (levamisol, vitamina E e mananoligossacarídeos - MOS) sobre as respostas biológicas, hematológicas e bioquímicas do pacu. Cada aditivo apresentou efeito singular sobre as variáveis analisadas, no que diz respeito ao desempenho e hematologia. O levamisol apresentou eficácia dose e tempo dependente, sendo a melhor resposta observada nos peixes suplementados com  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de levamisol na dieta durante 15 dias. A vitamina E é um nutriente essencial para obtenção de um crescimento adequado e manutenção dos parâmetros hematológicos dentro dos valores normais para o pacu. Os peixes suplementados com  $87,2 \text{ mg kg}^{-1}$  de vitamina E na dieta apresentaram melhor crescimento e nenhum distúrbio hematológico. A suplementação de MOS dietético não apresentou resultados consistentes, apesar da análise histológica do intestino, mesmo não sendo significativo ( $p>0,05$ ), ter apresentado valores absolutos do perímetro das vilosidades maior nos peixes suplementados com relação ao controle. Porém, mais estudos são necessário para determinar o mecanismo de ação do MOS como prebiótico na dieta do pacu, assim como a ação do levamisol sobre o ganho de peso em peixes.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*; Nutrição; Hematologia; Imunoestimulante

## ABSTRACT

### **Dietary immunostimulants and biological, biochemical and hematological responses of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles.**

The growth of aquaculture production as well as fish consumption can lead to intensification of fish production systems. The growing environmental concern regarding production of fish as food has required fish farmers to conform to Best Management Practices (BPMs), and that include reduction or, preferably, complete banning antibiotics from the production cycle through the use of immunostimulants. This study was set out to determine effects of different dietary additives (levamisole, vitamin E and mannan oligosaccharides - MOS) on biological, hematological and biochemical responses of pacu. All additives affected analyzed variables regarding to growth parameters and hematology. Levamisole presented time and dose efficacy, best results presented in fish supplemented with 100 mg kg<sup>-1</sup> of dietary levamisole for 15 days. Vitamin E supplementation is essential for growth and maintenance of normal hematological values for pacu. In the present study, fish supplemented with 82.7 mg kg<sup>-1</sup> of dietary vitamin E presented the best growth and no hematological disturbs. Dietary MOS did not present consistent results. Although not significant ( $p>0,05$ ), MOS-supplemented fish presented higher total villi perimeter, in absolute values, than fish fed control diet. However studies regarding the mode of action of MOS as prebiotic for pacu as well as the effects of levamisole on fish growth are necessary.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*; Nutrition; Hematology; Immunostimulant

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração representativa do pacu, *P. mesopotamicus*. Fonte: IBAMA/PNDPA [www.ibama.gov.br/pesca-amadora/pacus/](http://www.ibama.gov.br/pesca-amadora/pacus/)..... 16
- Figura 2 - Formação das células sanguíneas de peixes teleósteos, segundo Catton (1951)...... 28
- Figura 3 - Concentração de hemoglobina (A), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (B) e concentração de glicose plasmática (C) de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol na dieta ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )...... 55
- Figura 4 - Número total de leucócitos (A), linfócitos (B) e eosinófilos (C) de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol na dieta ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )...... 56
- Figura 5 - Concentração de hemoglobina (A), hemoglobina corpuscular média (B), concentração de hemoglobina corpuscular média (C) e proteína total plasmática (D) de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* aos 15, 30 e 45 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada ponto denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )...... 57
- Figura 6 - Número total de leucócitos (A), linfócitos (B), neutrófilos (C), monócitos (D), eosinófilos (E) e células granulocíticas especiais (CGE) (F) de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* aos 15, 30 e 45 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada ponto denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )...... 58
- Figura 7 - Concentração de glicose plasmática de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* aos 15, 30 e 45 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada ponto denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )...... 59
- Figura 8 - Número total de trombócitos de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol na dieta ( $\mu \pm DP$ ) aos 15 dias de experimento. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )...... 60

- Figura 9 - Número total de trombócitos de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* aos 15, 30 e 45 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ), suplementados com 100mg e 400mg de levamisol. Diferentes letras acima das respectivas colunas denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )..... 60
- Figura 10 - Modelo da regressão segmentada para o ganho de peso e taxa de crescimento específico de juvenis de *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de vitamina E na dieta. .... 86
- Figura 11 - Número de eritroblastos de juvenis de *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de vitamina E na dieta. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). .... 88
- Figura 12 - Análise de regressão da taxa de crescimento específico do pacu *P. mesopotamicus* em relação aos níveis de suplementação de MOS na dieta. .... 111
- Figura 13 - Número total de célula granulocítica especial (CGE) do pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de MOS na dieta ( $\mu \pm DP$ ) aos 42 dias de experimento. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste *t* ( $\alpha=0,05$ )..... 115
- Figura 14 - Número total de célula granulocítica especial (CGE) de pacu *P. mesopotamicus* aos 21, 42 e 63 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ), suplementados com 0,0, 1,0 e 1,5% de MOS. Diferentes letras em cada linha denotam diferença estatística pelo teste *t* ( $\alpha=0,05$ )..... 115
- Figura 15 - Perímetro das vilosidades intestinais do pacu *P. mesopotamicus* alimentados com a dieta controle e suplementados com 0,4% e 1,5% de MOS..... 116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química da dieta basal (controle) com base na matéria seca.....	47
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante período experimental. ....	52
Tabela 3 - Ganho de peso (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de sobrevivência (TS) do pacu <i>P. mesopotamicus</i> suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol.....	53
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros hematológicos de juvenis de pacu <i>P. mesopotamicus</i> para os tratamentos, tempos experimentais e interação entre os tratamentos e tempos experimentais de coleta ( $\alpha=0,05$ ). ....	54
Tabela 5 - Composição basal das dietas experimentais.....	78
Tabela 6 - Níveis esperados e detectados de vitamina E nas dietas experimentais.....	79
Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante período experimental. ....	84
Tabela 8 - Ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), índice de conversão alimentar (ICA) e taxa de crescimento específico de juvenis de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) alimentados com diferentes níveis de vit. E na dieta. ....	85
Tabela 9 - Número total de eritrócitos (Eri), hematócrito (Htc), concentração de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número total de eritroblastos (Eritrob), proteína total plasmática e concentração de glicose plasmática (Glic) de juvenis de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) alimentados com diferentes níveis de vit. E na dieta. ....	87
Tabela 10 - Número total de trombócitos (Tromb) e leucócitos (Leuc) e contagem diferencial de leucócitos (linfócitos (Linf), monócitos (Mon), neutrófilos (Neu), eosinófilos (Eos) e célula granulocítica especial (CGE)) de juvenis de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) alimentados com diferentes níveis de vit. E na dieta. ....	89
Tabela 11 - Composição química da dieta comercial (controle) com base na matéria seca. ....	103
Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante período experimental. ..	109
Tabela 13 - Ganho de peso (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de sobrevivência (TS) do pacu <i>P. mesopotamicus</i> suplementados com diferentes níveis de inclusão de MOS.....	110

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros hematológicos de juvenis de pacu <i>P. mesopotamicus</i> para os tratamentos, tempos experimentais e interação entre os tratamentos e tempos experimentais de coleta ( $\alpha=0,05$ ). .....	112
Tabela 15 - Variáveis hematológicas ( $\mu \pm DP$ ) e bioquímicas ( $\mu \pm DP$ ) de juvenis de <i>P. mesopotamicus</i> suplementados com diferentes níveis de inclusão de MOS.....	113
Tabela 16 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos do pacu ( $\mu \pm DP$ ) aos 21, 42 e 63 dias de experimento. ....	114

## 1 INTRODUÇÃO

A produção animal vem experimentando avanços tecnológicos substanciais nas áreas de melhoramento genético, manejo, sanidade e nutrição. A piscicultura é uma atividade que vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteína para o consumo humano, sendo a atividade que mais tem crescido em todo o mundo, crescimento este da ordem de 10% ao ano (QUEIROZ et al., 2005). Existe ainda uma tendência de aumento na produção aquícola e no consumo *per capita* de peixes nos países da América Latina (FAO, 2006). O Brasil se insere no contexto mundial como um país com grande potencial para essa atividade, já que possui um vasto território e suas condições climáticas favorecem a piscicultura de água doce. Seguindo esta tendência, observa-se a intensificação cada vez maior dos sistemas de produção de peixes praticados no Brasil (QUEIROZ et al., 2005).

Sistemas intensivos de produção são caracterizados pelo adensamento populacional, podendo chegar até  $60 \text{ kg m}^{-3}$  (COLT, 1991; OZÓRIO; AVNIMELECH; CASTAGNOLLI, 2004). Esse adensamento provoca um estado de estresse crônico nos peixes somado ao manejo inerente aos sistemas intensivos de produção (manipulação, reprodução artificial, transporte etc.), com conseqüências deletérias ao seu sistema imunológico (BARCELLOS; SOUZA; WOEHL, 2000; PAVANELLI et al., 2000; URBINATI; CARNEIRO, 2004; VAL; SILVA; VAL, 2004). A concentração dos animais e o manejo intenso inerentes aos sistemas intensivos de produção induzem a disseminação de patógenos (ENG; TECH, 2002) ocasionando surtos epizooticos com grande mortalidade de peixes e acarretando grandes prejuízos ao produtor.

Dentre os patógenos que podem causar perdas econômicas, temos as bactérias. A exemplo da produção de mamíferos e aves, a indústria aquícola faz uso de antimicrobianos para controlar doenças bacterianas nos peixes. Muitas vezes, antibióticos são ministrados aos animais com função profilática e terapêutica contra agentes bacterianos, ou com dosagens subterapêuticas com função de promotores de crescimento. Essa prática é muito comum; por exemplo, cerca de metade dos antibióticos produzidos nos EUA são usados dessa maneira (McPHEARSON et al., 1991). No entanto, essa técnica pode ocasionar o desenvolvimento de cepas bacterianas com resistência a esses antibióticos (resistência múltipla aos antibióticos – MAR), fenômeno já registrado no Brasil (COSTA; CYRINO, 2006) e uma característica que pode ser transmitida para outras bactérias, reduzindo a eficácia do tratamento com quimioterápicos (McPHEARSON et al.,

1991). Essas cepas resistentes ainda podem gerar impactos com relação ao tratamento de enfermidades humanas (saúde pública) e no próprio ambiente de produção, o ambiente aquático (SMITH; HINEY; SAMUELSEN, 1994).

Com a crescente conscientização da necessidade de adoção de técnicas adequadas para produção de alimento para consumo humano, muito se tem falado na adoção das Boas Práticas de Manejo (BPMs) (BOYD; QUEIROZ, 2004) em sistemas de produção aquícola, sendo que uma delas consiste na redução ou não utilização de antimicrobianos durante o ciclo de produção em favor da utilização de substâncias capazes de modular o sistema imune dos peixes, aumentando sua resistência aos agentes patogênicos através do estímulo de seu sistema imunológico, e uma alternativa segura ao uso dos antibióticos e quimioterápicos em piscicultura interior (ANDERSON, 2004; GATESOUBE, 1999; KUMARI; SAHOO, 2006; RAA, 2000). Os imunostimulantes são substâncias utilizadas para estimular a função de defesa imunológica do organismo (RAA, 2000) e os estudos de hematologia são comumente utilizados como diretrizes ou indicadores do seu estado funcional (SCHRECK; MOYLE, 1990).

### **1.1 Aqüicultura no Brasil**

Segundo Castagnolli (2004), nos seus primórdios a aqüicultura era realizada de forma amadora e pelo desenvolvimento de tecnologia de criação baseada em tentativas e no erro-acerto. A fase comercial e industrial da aqüicultura no país teve início na década de 80, quando aumentaram os investimentos na produção de alevinos, com predomínio de espécies nativas, como peixes redondos (pacu, tambaqui e seus híbridos). O território brasileiro tem grande potencial para essa atividade, já que possui vasta extensão, recursos hídricos abundantes e condições climáticas favoráveis à produção de peixes em confinamento (BORGHETTI; OSTRENSKY, 2002; CASTAGNOLLI, 2000). Condizente com sua dimensão territorial são encontradas espécies de peixes das mais variadas formas e tamanhos, sendo muitas delas aptas à piscicultura comercial, pesca esportiva ou piscicultura ornamental (CRESCÊNCIO, 2005). Uma delas é o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).



## 1.2 Aspectos da biologia e produção do pacu

O pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characiformes; Characidae) (Figura 1) encontra-se naturalmente distribuído na América do Sul, sendo considerada espécie “moradora habitual de grandes águas” (GODOY, 1975). É representante da superordem Ostariophysa, à qual pertencem os peixes de maior valor comercial na pesca e na piscicultura brasileira (URBINATI; GONÇALVES, 2005). É um Characiforme de carne branca, considerada de excelente qualidade para alimentação humana (SAMPAIO-OLIVEIRA; CONTE; CYRINO, 2004). A aquicultura na Região Sudeste existe desde o início do século XX, engloba grande variedade de espécies, sendo o pacu uma das poucas espécies produzidas nos quatro estados da região (PEZZATO; SCORVO-FILHO, 2000). A espécie possui características que a tornam amplamente desejáveis para piscicultura, como elevado ganho de peso e adaptabilidade aos ecossistemas aquaculturais; em adição, é uma espécie muito apreciada na pesca esportiva (JOMORI et al., 2003; SAMPAIO-OLIVEIRA; CONTE; CYRINO, 2004).

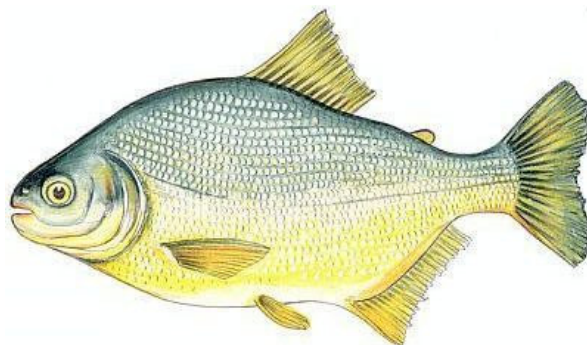


Figura 1 – Ilustração representativa do pacu, *P. mesopotamicus*

Fonte: IBAMA/PNDPA (<http://www.ibama.gov.br/pesca-amadora/pacus/>)

Devido a essas características, a espécie vem sendo cada vez mais produzida de forma intensiva e muitas vezes sob condições extremamente estressantes que podem causar distúrbios em seu estado fisiológico e predispor a doenças bacterianas e parasitárias oportunistas (URBINATI; CARNEIRO, 2004; URBINATI; GONÇALVES, 2005). Sendo assim, é de grande importância a adoção de técnicas e métodos (e.g. aditivos alimentares) que venham a aumentar a resistência do peixe às doenças e sua capacidade de resposta às situações estressantes, através da modulação de seu sistema imune (GATESOUBE, 1999).

## 1.4 Nutrição X Sanidade

Em muitas espécies animais, a dieta pode influenciar nos parâmetros imunológicos (número de leucócitos e produção de anticorpos), assim como a capacidade do animal de resistir a doenças infecciosas (ALCORN et al., 2003; BLAZER, 1991; LALL, 2000; LANDOLT, 1989; SITJA-BOBADILLA; PÉREZ-SANCHEZ, 1999). Com isso, pesquisas com o uso de dietas preparadas artificialmente como alimentos funcionais, os quais têm a capacidade de atuar na saúde do organismo cultivado e resistência ao estresse e agentes causadores de doenças (GATLIN, 2002), assumem grande importância. Os aditivos ou suplementos alimentares utilizados na aquicultura com o objetivo de melhorar o desempenho e sanidade dos animais são imunonutrientes (vitaminas e minerais), imunostimulantes, probióticos e prebióticos.

Os imunonutrientes são substâncias necessárias em quantidades adequadas, como quaisquer outros nutrientes, para o funcionamento normal do sistema imune, sendo envolvidos em diversas reações fisiológicas (GATLIN et al., 2006). Alguns nutrientes, como as vitaminas E e C, têm maior influência no sistema imune. A vitamina E é um nutriente lipossolúvel enquanto que a vitamina C é hidrossolúvel; entretanto, ambos possuem a mesma função biológica: atuam como antioxidantes protegendo macromoléculas celulares (DNA, proteínas, lipídeos) contra a oxidação por radicais livres durante o metabolismo normal, ou em condições adversas, como doença, estresse e poluição (CHEN et al., 2004). Trutas arco-íris suplementadas com altas doses de vit. E apresentam aumento da atividade de lisozima, produção de formas reativas de oxigênio por leucócitos do rim cefálico (KIRON et al., 2004), aumento da capacidade de fagocitose de leucócitos presentes na mucosa gastrointestinal (CLERTON et al., 2001). Hardie; Fletcher e Secombes (1990) registraram altas taxas de mortalidade em salmões do Atlântico alimentados com dietas deficientes em vit. E. Garoupas-malabar *Epinephelus malabaricus* alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vit. E exibem aumento do número de leucócitos, do *burst* oxidativo e lisozima (LIN; SHIAU, 2005a). Bagres do canal alimentados com dietas suplementadas com vit. E tiveram aumentada a capacidade de fagocitose de cepas virulentas de *Edwardsiella ictaluri* por macrófagos (WISE et al., 1993).

A vit. C também possui a capacidade de aumentar a migração e fagocitose quando acrescentados em culturas de macrófagos do rim cefálico da dourada *Sparus aurata* L., além de aumentar o *burst* oxidativo dessas células (MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998b). Em

trutas arco-íris, a suplementação da dieta com vit. C induziu incremento do *burst* oxidativo, da atividade fagocítica (VERLHAC et al., 1996) e lisozima, e após vacinação contra *Y. ruckeri*, aumento significativo na titulação de anticorpos (VERLHAC et al., 1998). Lin e Shiau (2005b) observaram aumento na resistência a *Vibrio carchariae* em garoupas-malabar alimentadas com dietas suplementadas com vit. C, bem como aumento do *burst* oxidativo dos leucócitos do rim cefálico e da atividade de lisozima.

A interação da vitamina C com E é uma das mais estudadas e conhecidas em peixes (CHEN et al., 2004; GARCIA et al., 2007; HAMRE et al., 1997; MONTERO et al., 1999). Ambas atuam como antioxidantes, sendo que a primeira atua na fase líquida e a segunda, na fase lipídica da membrana celular. O mecanismo de ação no qual a vitamina C atua como um “economizador” da vitamina E ainda é incerto, porém, estudos demonstram que o radical  $\alpha$ -oxitocoferil formado a partir da perda de hidrogênio do  $\alpha$ -tocoferil acetato (vit E) para peróxidos de lipídeos são reduzidos pela vitamina C, gerando o radical ascorbil ou o ácido dehidroascórbico e através de reações químicas ou enzimáticas com a glutatona, a vitamina C pode ser regenerada. Conseqüentemente, a vitamina E pode ser recuperada de seu radical  $\alpha$ -oxitocoferil por meio da oxidação da vitamina C (HAMRE et al., 1997).

Imunoestimulantes são substâncias químicas, sintéticas ou biológicas, capazes de aumentar a resistência do animal a doenças infecciosas, atuando no sistema imune inespecífico, através do aumento da atividade fagocítica e bactericida das células de defesa, podendo também atuar no sistema imune específico quando administrados como adjuvantes em vacinas. O uso de imunoestimulantes é um meio efetivo de aumentar a imunocompetência e resistência a infecções causadas por vírus, fungos, bactérias e parasitas (BRICKNELL; DALMO, 2005; MULERO et al., 1998; RAA, 2000; SAKAI, 1999).

A capacidade de aumentar a aptidão fagocítica das células, ativarem linfócitos e aumentar da resistência a doenças infecciosas dos imunoestimulantes tem sido consistentemente demonstrada. Os imunoestimulantes utilizados em peixes podem ser divididos em categorias de acordo com a sua composição; incluem compostos químicos, derivados de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas ou animais e hormônios (SAKAI, 1999). Esses subgrupos são independentes em seu modo de ação, uma vez que cada imunoestimulante age de maneira restrita à sua célula alvo. Tomando como exemplo o sistema fagocitário mononuclear, diferentes leucócitos possuem diferentes receptores que levam a diferentes respostas imunológicas

dependendo de qual receptor é ativado e a cascata de reações intracelulares subsequentes. Dessa maneira, Bricknell e Dalmo (2005) definem essa classe de imunoestimulante como compostos de ocorrência natural, que modulam o sistema imune através do aumento da resistência do hospedeiro a doenças que geralmente são causadas por agentes patogênicos.

Grande atenção vem sendo dada a essas substâncias e sua utilização na aquíicultura (CUESTA; ESTEBAN; MESEGUER, 2002). O manejo intenso a que são submetidos os peixes em sistemas intensivos de produção (alimentação intensiva, manipulação - seleção, reprodução -, despesca, transporte) rompe seu equilíbrio homeostático, principalmente seu sistema imune (BARCELLOS; SOUZA; WOEHL, 2000; YIM; LAM; SIN, 1995), aumentando sua susceptibilidade a enfermidades fúngicas, bacterianas e parasitárias (DAVIS; GRIFFIN; GRAY, 2002). Grande parte desses organismos potencialmente patogênicos ocorre no ambiente como saprófitas, utilizando o material orgânico e mineral presente no sedimento dos sistemas de produção para crescimento e multiplicação. Uma vez instalada a infecção, muito trabalho e tempo são perdidos na tentativa de se eliminar o agente patogênico do sistema de produção. Em adição, peixes resistentes infectados podem tornar-se fonte de infecção – vetores sadios – e de dispersão do agente etiológico no ambiente (KUSUDA; KAWAI, 1998).

O levamisol é um composto sintético do grupo dos imidotiazóis, utilizado como anti-helmíntico, sendo a forma levógera do tetramisol mais potente que a sua forma dextrógera. Seu efeito imunoestimulante é caracterizado pelo aumento da proliferação de linfócitos T, da quimiotaxia e atividade fagocitária, além do aumento na produção dos anticorpos (BONAMIN; PAULINO, 1996). Sua capacidade imunoestimulatória em peixes pode ser observada pelo aumento do número de leucócitos circulantes, da atividade fagocitária de leucócitos, da atividade mieloperoxidase de neutrófilos e dos níveis séricos de lisozima (CUESTA; ESTEBAN; MESEGUER, 2002; CUESTA; MESEGUER; ESTEBAN, 2004; LI; WANG; GATLIN, 2006; LI et al., 2006; MULERO et al., 1998). Siwicki (1989) registrou aumento no número de leucócitos e capacidade fagocítica de neutrófilos, assim como nos níveis de lisozima após administração oral de levamisol para carpas *Cyprinus carpio*. Kajita et al. (1990) observaram melhora na resposta imune inespecífica, como aumento da atividade fagocítica e de células NK, da concentração sérica de complemento e atividade bactericida após injeção de levamisol em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss*; após desafio com cepas virulentas de *Vibrio anguillarum*, observaram uma maior resistência à doença em relação ao grupo controle. Entretanto, apesar destas

evidências, é preciso especial atenção na utilização desse composto químico, já que seu efeito é dose e tempo-dependente, ou seja, altas doses podem causar um quadro de imunossupressão, assim como subdosagens podem não ser eficientes (LI; WANG; GATLIN, 2004; MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998a).

Outro fator imunestimulante extensamente estudado são os probióticos e prebióticos. Probióticos são suplementos compostos por microrganismos vivos, os quais afetam de forma positiva a microbiota intestinal e saúde do hospedeiro (IRIANTO; AUSTIN, 2002). Porém, a definição posta anteriormente se encaixa quando seu uso é feito em humanos ou animais terrestres. A utilização em animais aquáticos impõe uma série de fatores inerentes à fisiologia do animal e ambiente em que vive e sua relação com o mesmo. Dessa forma, uma definição adaptada para seu uso em animais aquáticos define probiótico como: “microrganismos vivos com efeitos benéficos no hospedeiro, modificando a comunidade microbiana associada ao indivíduo ou ao ambiente, promovendo melhor aproveitamento do alimento ou valor nutricional, resistência a doenças ou ambiente em que vive” (KESACORDI-WATSON et al., 2008; WANG; LI; LIN, 2008). O mecanismo de ação dos probióticos, segundo Fooks, Fuller e Gibson (1999) e Irianto e Austin (2002) consiste em:

- ✓ alterar o metabolismo microbiano pelo aumento ou diminuição da produção de enzimas chaves;
- ✓ exclusão competitiva com microrganismos potencialmente patogênicos através da produção de substâncias antimicrobianas;
- ✓ redução do pH luminal;
- ✓ bloqueio de sítios de adesão;
- ✓ estímulo da resposta humoral e celular.

Entretanto, para o desenvolvimento de probióticos para uso na aqüicultura, de acordo com Kesacordi-Watson et al. (2008), alguns requisitos devem ser levados em conta:

- ✓ o probiótico não deve ser nocivo ao hospedeiro que irá utilizá-lo;
- ✓ deve ser ingerido pelo hospedeiro e possuir potencial para colonizar e replicar o trato gastrointestinal do hospedeiro;
- ✓ deve atingir o local onde irá atuar;
- ✓ deve ter efeito *in vivo* de acordo com resultados encontrados *in vitro*;
- ✓ não deve conter genes de resistência a antibióticos.

Estudos sobre uso de probióticos na aquicultura em diversas espécies de peixes e crustáceos de interesse econômico e seus efeitos sobre o desempenho e sanidade podem ser encontrados em revisões sobre o assunto realizado por Irianto e Austin (2002), Kesacordi-Watson et al. (2008) e Wang, Li e Lin (2008).

Os prebióticos constituem substâncias que não são digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo animal no processo de digestão, mas seletivamente fermentados por determinados microrganismos do trato gastrintestinal, com benefícios ao hospedeiro com melhoras no crescimento, digestão dos nutrientes, imunidade e resistência às doenças (BURR; GATLIN, 2005; GATLIN et al., 2006), e que podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou adicionados a ela através de fontes exógenas concentradas (SILVA; NÖRNBERG, 2003). Para que um ingrediente da dieta seja classificado como um prebiótico, segundo Fooks, Fuller e Gibson (1999) deve:

- ✓ não ser hidrolisado ou absorvido na porção inicial do trato gastrintestinal;
- ✓ ser fermentado por bactérias potencialmente benéficas ao hospedeiro na porção do cólon;
- ✓ alterar a microbiota do cólon de modo a torná-la saudável;
- ✓ induzir efeitos benéficos a saúde do hospedeiro.

Dentre os prebióticos, os derivados de bactérias e leveduras, entre eles, muramil-dipeptídeo (MDP); lipopolissacarídeos de membrana (LPS); adjuvante completo de Freund; bacterinas de diversas espécies; polissacarídeos como glucanas, quitina e quitosana presentes no exoesqueleto de crustáceos e parede celular de alguns fungos e oligossacarídeos são utilizados como imunoestimulantes na aquicultura.

O MDP é um peptídeo biologicamente ativo presente na superfície de bactérias do gênero *Mycobacterium* (SAKAI, 1999). Seu efeito imunoestimulante foi descrito por Kodama et al. (1993) após injeção intraperitoneal em trutas arco-íris, que apresentaram aumento da atividade fagocítica, *burst* oxidativo e atividade migratória de leucócitos do rim, bem como aumento da resistência frente a desafio com cepa virulenta de *A. salmonicida*. Olivier, Evelyn e Lallier (1985) registraram que salmões Coho *Oncorhynchus kisutch* injetados com MDP associado com adjuvante incompleto de Freund modificado, apresentaram aumento de 47 vezes na resistência a infecções por *A. salmonicida*.

Lipopolissacarídeos de membrana (LPS) são componentes característicos da parede celular de bactérias gram-negativas (SAKAI, 1999; SECOMBES, 1994). Em mamíferos, os LPS são responsáveis por efeitos adversos como hipotensão, coagulação intravascular disseminada, choque e morte. Entretanto, vertebrados inferiores (anfíbios e peixes) são resistentes aos efeitos adversos dos LPS que, em pequenas quantidades, têm a capacidade ativar macrófagos, estimular a formação de espécies reativas de oxigênio e proliferação de linfócitos B (SARMENTO et al., 2004; SAKAI, 1999). Alevinos de salmão do Atlântico alimentados com LPS adicionados à ração apresentaram aumento na produção de imunoglobulinas em relação ao controle (GUTTVIK et al., 2002). Quando LPS foi injetado em pargos *Pagrus major*, Salati, Hamaguchi e Kusuda (1987) observaram aumento da atividade fagocítica dos leucócitos sanguíneos. Da mesma forma, McArthur, Thomson e Fletcher (1985) demonstraram um aumento da atividade migratória dos leucócitos em solha *Pleuronectes platessa* injetados com LPS. Testes realizados *in vitro* mostraram a capacidade do LPS de estimular a fagocitose e produção de ânions superóxidos em macrófagos de salmão do Atlântico (SOLEM; JORGENSEN; ROBERTSEN, 1995). Porém, Sarmento et al. (2004) observaram decréscimo na produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos de robalo Europeu *Dicentrarchus labrax* 18 horas após exposição das células ao LPS.

Estruturas presentes na parede celular de leveduras e fungos, as  $\beta$ -glucanas, unidades de glicose conjugadas por ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6, vêm sendo extensamente utilizados em peixes, possuindo a capacidade de estimular seu sistema imune inespecífico (GATESOUBE, 1999; RAA, 2000; SECOMBES, 1994) e melhorar o microambiente intestinal (IRIANTO; AUSTIN, 2002). Quando administrados por via oral ou intraperitoneal,  $\beta$ -glucanas induzem aumento na atividade de lisozima, fagocitose, contagem total de leucócitos (BAGNI et al., 2005; RODRIGUÉZ et al., 2003), além do acréscimo na taxa de sobrevivência, quando desafiados com cepas virulentas de *Aeromonas hydrophila* (SAMUEL; LAM; SIN, 1996; SELVARAJ; SAMPATH; SEKAR, 2005), *Photobacterium damsela* (COUSO et al., 2003), *Edwardsiella ictaluri* (CHEN; AINSWORTH, 1992). Porém o mesmo não foi observado após administração oral em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*, posteriormente desafiadas com *Streptococcus iniae* (WHITTINGTON; LIM; KLESIUS, 2005), ou em “striped snakehead” *Channa striata*, desafiados com *Aphanomyces invadans*, agente causador da Síndrome Ulcerativa Epizoótica (MILES et al., 2001).

Carpas submetidas ao tratamento com glucanas e lipopolissacarídeos de membranas de cepas virulentas de *Aeromonas hydrophila* por diferentes meios (injeção intraperitoneal, imersão ou por via oral) por 16 dias e posteriormente desafiadas com cepas de *A. hydrophila* apresentaram maior percentual de sobrevivência somente nos tratamentos recebidos por via intraperitoneal e oral (SELVARAJ; SAMPATH; SEKAR, 2006).

Salmões do Atlântico suplementados com 1% de glucana na dieta por sete dias não apresentaram melhoras na atividade de macrófagos da porção cranial do rim, produção de lisozima, *burst* oxidativo e aumento da resistência a doença conhecida como amebíase das brânquias (*Neoparamoeba* spp.) (BRIDLE et al., 2005). Em peixes da espécie *Pseudocianena crocea* alimentados com dietas suplementadas com dois níveis de  $\beta$ -glucanas (0,09 e 1,8%), Ai et al. (2007) registraram que os animais que receberam a dieta com a maior concentração de glucanas não apresentaram melhoras no sistema imunológico e resistência a infecção por *Vibrio harveyi* quando comparados a dieta controle.

O uso de glucanas como adjuvantes em vacinas é descrito por diversos autores, os quais descreveram sua capacidade em aumentar a eficácia da vacina aumentando a produção de anticorpos contra proteínas presentes na superfície de bactérias (FIGUERAS; SANTARÉM; NOVOA, 1998; SAKAI, 1999; SAMUEL; LAM; SIN, 1996; SECOMBES, 1994; SELVARAJ; SAMPATH; SEKAR, 2005; WHITTINGTON; LIM; KLESIUS, 2005). Esse processo é mediado pelo estímulo da função de processamento e apresentação do antígeno, necessários para que haja produção de anticorpos pelos linfócitos (SECOMBES, 1994).

Os oligossacarídeos são complexos de carboidratos amplamente utilizados como prebióticos. Dentre os estudados são os fructoligossacarídeos (FOS), transgalactoligossacarídeos (TOS), xilooligossacarídeos (XOS), galactooligossacarídeos (GOS), inulina e mananoligossacarídeos (MOS). Em animais aquáticos, trabalhos com a utilização de oligossacarídeos na dieta vêm sendo realizados com FOS, GOS, XOS, MOS e inulina.

O MOS, complexo de carboidratos não digeríveis derivados da parede celular de cepas selecionadas de leveduras vivas, *Saccharomyces cerevisiae*, constituem uma fonte rica em manose disponível para adesão bacteriana, adsorvendo os patógenos e impedindo sua ligação à parede intestinal (GOUVEIA et al., 2006; VENDEMIATTI; COSTA; CYRINO, 2003). Quando a aderência das bactérias aos enterócitos é inibida, não há formação de colônias que possam indisponibilizar nutrientes para o animal ou infeccionar suas células intestinais (FERKET;



PARKS; GRIMES, 2002). Com isso, observa-se aumento da integridade das vilosidades intestinais e, conseqüentemente, melhora da saúde intestinal e um melhor aproveitamento dos nutrientes (PELICANO et al., 2005).

Quando mananoligossacarídeos (MOS) são utilizados como aditivos na dieta de suínos e aves, promovem aumento no ganho de peso e sobrevivência (NEWMAN; NEWMAN, 2001; SPRING et al., 2000; ZDUNCZYK et al., 2005). Na aquicultura, poucos são os trabalhos desenvolvidos que contemplam a utilização de MOS na dieta e seus efeitos no sistema imunológico e desempenho. A adição de MOS na dieta promoveu melhora nos índices de desempenho como ganho de peso e conversão alimentar em lagostas européias, *Homarus gammarus* (DANIELS et al., 2006, 2007) e camarões da espécie *Penaeus semisulcatus* (GENC et al., 2007). Em peixes, a adição de MOS à dieta também induz melhora nos índices de desempenho (ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência) e no status imunológico, como produção de anticorpos, atividade bacteriolítica, lisozima e complemento em trutas arco-íris (STAYKOV et al., 2007), carpa comum, (STAYKOV; DENEV; SPRING, 2005) e robalo Europeu (TORRECILLAS et al., 2007). Porém, os estudos sobre a dose de administração e modo de ação do MOS ainda não são suficientemente esclarecedores, já que resultados contraditórios foram observados em tilápias do Nilo (VENDEMIATTI; COSTA; CYRINO, 2003), esturjão do Golfo do México *Acipenser oxyrinchus desotoi* (PRYOR et al., 2003), salmão do Atlântico, *Salmo salar* (GRISDALE-HELLAND; HELLAND; GATLIN, 2008) e bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (WELKER et al., 2007).

A suplementação de XOS e parede celular de leveduras na dieta de peixes da espécie *Scophthalmus maximus* por 72 dias promoveu melhora no ganho de peso, taxa de crescimento específico e conversão alimentar, além de aumentar a concentração de lisozima sérica, componentes do complemento (C3 e C4) e fagocitose dos leucócitos (LI et al., 2008). Em peixes da espécie *Carassius auratus gibelio*, a suplementação de 50, 100 e 200 mg XOS/kg de dieta por 45 dias também promoveu melhoras no desempenho e nas concentrações de enzimas digestivas como amilase e proteases (XU et al., 2008).

Salmões do Atlântico, *Salmo salar* suplementados com FOS e GOS na concentração de 10 g/kg dieta não apresentaram melhoras no desempenho, porém a inclusão de FOS na dieta proporcionou uma melhor eficiência alimentar (GRISDALE-HELLAND; HELLAND; GATLIN, 2008). A inclusão de 2% de inulina na dieta de larvas de peixes da espécie *Psetta maxima* por 30

dias também não promoveu melhoras nos índices de desempenho quando comparados ao controle (MAHIOUS et al., 2006), sendo que, em estudos anteriores, a inclusão de 15% de inulina na dieta de *Salvelinus alpinus* por 30 dias ocasionou lesões nos enterócitos dos peixes (OLSEN et al., 2001).

Outros polissacarídeos com capacidade de influenciar o sistema imune são a quitina e a quitosana, componentes estruturais do exoesqueleto de crustáceos e insetos e da parede celular de algumas espécies de fungos (SAKAI, 1999; SECOMBES, 1994). A administração desses componentes por via intraperitoneal ou imersão teve efeito positivo no sistema imunológico dos peixes tratados, através do aumento da atividade do complemento, citotoxicidade celular, *burst* oxidativo e da capacidade de fagocitose (ESTEBAN et al., 2000, 2001). Em crustáceos submetidos ao tratamento com quitina e quitosanas, assim como em peixes, foi descrito efeito positivo no sistema imunológico. Wang e Chen (2005) observaram aumento na taxa de sobrevivência de camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* quando desafiados com cepas de *Vibrio alginolyticus*, aumento na contagem total de hemócitos, do *burst* oxidativo e da atividade fagocítica dos leucócitos.

Muitas outras substâncias possuem influência sobre o sistema imunológico e podem ser utilizadas como moduladores deste sistema. Dentre estas se destacam os hormônios (HARRIS; BIRD, 2000); os oligodeoxinucleotídeos sintéticos (MALINA; TASSAKKA; SAKAI, 2002; MALINA; TASSAKKA; SAKAI, 2005); o adjuvante completo de Freund (SAKAI, 1999); e as bacterinas (JENEY; ANDERSON, 1993).

Os imunoestimulantes são importantes ferramentas com potencial para utilização na aqüicultura como forma de minimizar perdas devido às doenças que acometem os peixes, e que acarretam prejuízos ao produtor. Mesmo assim, seu uso deve ser ainda parcimonioso, já que ainda são necessários estudos no que diz respeito ao seu mecanismo de ação, na forma, tempo e concentração administrado, além da necessidade de considerar o estágio de desenvolvimento do animal. Os imunoestimulantes podem ser administrados de forma contínua ou em períodos de curta duração, sendo esta última a forma mais aconselhada. Quando administrados de forma contínua, imunoestimulantes podem causar tolerância no sistema imunológico tornando-o dessensibilizado, ou até mesmo causar um estado de imunossupressão (BRICKNELL; DALMO, 2005). Quando fornecidos por curtos períodos (4-6 semanas), imunoestimulantes induzem aumento na resposta imune e retorno às condições normais após sua total metabolização. Isso dá

ao produtor maior flexibilidade no manejo da criação, uma vez que ele pode utilizar o aditivo em períodos de maior risco de haver surtos epizoóticos, como na primavera e outono em que há maior variação de temperatura, antes de alguma manipulação (transporte ou transferência para outro tanque) e época de reprodução (BRICKNELL; DALMO, 2005; SAKAI, 1999).

Bricknell e Dalmo (2005) alertam para a necessidade de se considerar o estágio de desenvolvimento do animal para a administração de imunostimulantes. A utilização de imunostimulantes na larvicultura é preconizada durante o esgotamento do saco vitelínico ou início da alimentação exógena pelas larvas, ou na metamorfose. No estágio larval, o sistema imunológico do peixe ainda não está completamente desenvolvido, e o uso dos imunostimulantes visa potencializar este sistema até que se desenvolva o suficiente para combater potenciais patógenos invasores. Por outro lado, uma vez que o sistema imune das larvas ainda não é totalmente funcional, o uso de imunostimulantes nesta fase pode trazer efeitos deletérios em seus órgãos linfóides em desenvolvimento, p. ex. timo; entretanto, nada ainda foi provado cientificamente a este respeito.

Como consequência da intensificação dos sistemas de produção e maior incidência de surtos epizoóticos, o uso indiscriminado de antibióticos vem originando cada vez mais o surgimento de cepas bacterianas resistentes. O uso de vacinas ainda é incipiente, já que confere defesa apenas a determinados patógenos, além de seu custo. A utilização de imunostimulantes não apresenta eficácia tão boa quanto quimioterápicos e vacinas, mas confere resistência a uma gama maior de patógenos. Enquanto os quimioterápicos são utilizados de forma terapêutica, os imunostimulantes e vacinas são utilizados profilaticamente, ou seja, atuam antes de a doença instalar-se nos animais, promovendo um melhor desenvolvimento do plantel, sem maiores perdas econômicas (SAKAI, 1999).

Uma maneira de mensurar a capacidade do animal de responder a essas situações e monitorar a condição sanitária do animal é a realização de exames hematológicos, já que em peixes a presença, a quantidade e proporção das diferentes células no sangue periférico refletem o estado fisiológico específico do animal num dado momento ou período da vida (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

## 1.5 Hematologia de peixes teleósteos

Hematologia é o estudo do sangue ou da soma dos conhecimentos sobre o sangue, e grande parte das informações consiste em medidas de valores de parâmetros em condições orgânicas normais e anormais (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004), uma vez que o sangue é o fluído corporal mais conspícuo e acessível dos vertebrados (HOUSTON, 1997). O sangue é um tecido líquido, móvel, do tipo conjuntivo e que está em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos, constituindo uma das grandes forças homeostáticas do organismo (KALASHNIKOVA, 1976). Esse tecido tem como função distribuir calor, transportar os gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

Somado ao fato de apresentarem diferenças no processo de hematopoiese, o estudo do tecido sangüíneo dos peixes exige algumas adaptações ou técnicas diferenciadas em comparação ao sangue de mamíferos. Os peixes são desprovidos de medula óssea e de linfonodos, assim o tecido linfóide e mielóide estão, geralmente, associados no mesmo órgão. Nos teleósteos, o órgão responsável pela hematopoiese é a porção cefálica do rim (ROCHA; FLORES, 2001) que, além da produção de anticorpos (função imunológica), promove a interação imunoendócrina, de importância para ambos os sistemas, atuando na produção de anticorpos e catecolaminas (WEYTS et al., 1999). Além da porção cefálica do rim, a hematopoiese também pode ser realizada no estroma esplênico e nos espaços periportais hepáticos, na submucosa intestinal e no timo (MATUSHIMA; MARIANO, 1996).

Várias teorias foram propostas nos últimos anos sobre a origem e desenvolvimento das células sangüíneas. Duthie (1939)<sup>1</sup> apud Tavares-Dias e Moraes (2004), propôs que uma célula pluripotente, denominada grande hemoblasto linfóide, originaria os granulócitos por transformação direta, que após divisão mitótica formaria os pequenos hemoblastos linfóides, os quais originariam os eritrócitos, trombócitos e linfócitos. Catton (1951) introduziu a teoria difilética, no qual o grande hemoblasto linfóide, derivado da transformação de células reticulares seria o precursor dos granulócitos, enquanto que, os pequenos hemoblastos linfóides, originados das células endoteliais seriam os precursores dos eritrócitos, trombócitos e linfócitos (Figura 2).

---

<sup>1</sup> DUTHIE, E.S. The origin, development and functions of the blood cells in certain marine teleosts. I. Morphology. *Journal of Anatomy*, London, v. 73, n. 3, p. 96-111, 1939.

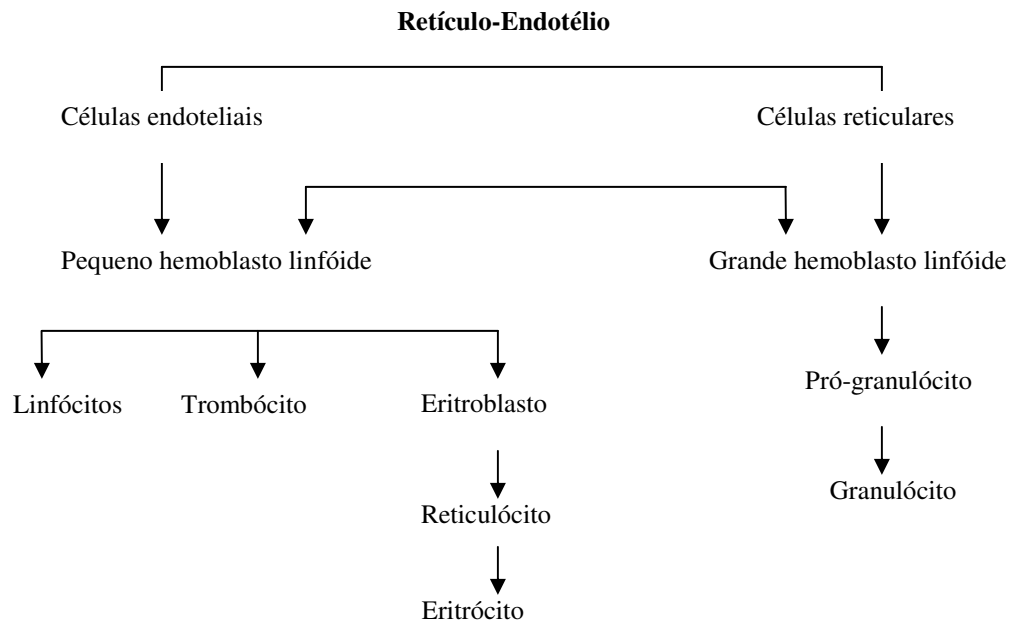


Figura 2 - Formação das células sanguíneas de peixes teleosteos, segundo Catton (1951)

Os peixes desenvolveram numerosas estratégias de adaptação às variações extremas de temperatura, salinidade, pressão, pH, oxigênio e CO<sub>2</sub> do ambiente aquático. Entre estas estratégias, destacam-se: i) aumento da superfície branquial para facilitar as trocas gasosas em águas com baixas concentrações de O<sub>2</sub>; ii) diminuição dos níveis de atividade para reduzir as exigências em O<sub>2</sub>; iii) desenvolvimento de componentes múltiplos de hemoglobina com diferentes propriedades funcionais e, iv) especificidade de leucócitos e rápida alteração de sua frequência (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Junto dessas características altamente especializadas e “desenvolvidas”, observam-se também algumas “primitivas”, como a presença de núcleo e baixa quantidade de hemoglobina nos eritrócitos e pequeno volume dos elementos figurados, que caracterizam um baixo metabolismo total. Segundo Wintrobe (1934), a presença de núcleo nos eritrócitos faz com que haja um maior consumo do oxigênio que transportam em relação aos eritrócitos anucleados de mamíferos, parecendo ser menos eficientes.

Os eritrócitos de peixes são ovais, têm núcleo central acompanhando o formato da célula, com cromatina compactada e sem nucléolos. O citoplasma, relativamente abundante, apresenta-se acidófilo (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Os eritrócitos maduros são as células

mais numerosas no sangue, porém em muitas espécies é comum a presença de eritrócitos imaturos (reticulócitos e eritroblastos) no sangue periférico (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Tal fato deve ser interpretado com cuidado, uma vez que há um equilíbrio entre os tipos de células, sendo as células maduras mais numerosas. A quebra desse equilíbrio pelo excesso de células imaturas sugere a existência de alguma perturbação na sua maturação. A principal função dos eritrócitos é transportar  $O_2$  e parte do  $CO_2$  do sangue, através do pigmento respiratório, a hemoglobina. Conseqüentemente, qualquer deficiência ou alteração nos eritrócitos será traduzida como deficiência de  $O_2$  nos tecidos.

Os trombócitos são células equivalentes às plaquetas em mamíferos, porém estruturalmente diferentes. Em contraste com as plaquetas de mamíferos, que são fragmentos de células anucleadas, os trombócitos são células completas (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), podendo possuir formas variadas (elípticos, arredondados, ovais ou fusiformes), com um núcleo grande que acompanha o formato da célula (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Ao microscópio de luz comum, os trombócitos aparecem como células predominantemente elípticas, com núcleo fusiforme e hiperconcentrado. A ultra-estrutura dessas células é semelhante àquelas descritas para microscopia comum, ou seja, apresentam contorno citoplasmático regular e podem apresentar invaginações e prolongamentos digitiformes.

Os trombócitos também são encontrados no sangue de répteis, aves e anfíbios, apresentando funções descritas de hemostasia e homeostasia (BELETTI et al., 1998). Em peixes, essas células possuem outras funções, entre elas, sugere-se que respondam a situações mórbidas de modo semelhante às plaquetas de mamíferos (STOSKOPF, 1993). Os trombócitos muitas vezes são confundidos com linfócitos, possivelmente devido à sua fragilidade; durante a preparação da extensão sangüínea pode perder seu citoplasma deixando evidente apenas o núcleo. Devido sua semelhança aos linfócitos, os trombócitos eram incluídos na contagem diferencial de leucócitos (TAVARES-DIAS; MARTINS; KRONKA, 1999; TAVARES-DIAS; SANDRIN; CAMPOS-FILHO, 1999; TAVARES-DIAS et al., 1999b, 2000). Do ponto de vista da patologia e devido às evidências de sua participação nos mecanismos de defesa, e ainda após o desenvolvimento de técnica adequada para sua contagem, leucócitos e trombócitos foram incluídos num único bloco denominado células sangüíneas de defesa orgânica (TAVARES-DIAS et al., 1999a, 2002a, 2002b).

Segundo Jakowska (1959)<sup>2</sup> apud Tavares-Dias e Moraes (2004), é comum a presença de leucócitos imaturos na circulação sangüínea de peixes em diferentes estágios ou fases de desenvolvimento. A grande quantidade de leucócitos na circulação periférica e seu rápido *turnover* indicam que os peixes são mais bem protegidos contra diferentes microrganismos patogênicos que vertebrados terrestres, sendo que tais organismos aparecem consideravelmente em maior número por unidade de volume de água do que os patógenos dos vertebrados terrestres por unidade de volume de ar (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

Linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos são os leucócitos usualmente observados na circulação de peixes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004); essa denominação é semelhante àquela utilizada em vertebrados terrestres. Os linfócitos são células predominantemente arredondadas, com núcleo ocupando quase toda célula e com citoplasma apresentando projeções que conferem contorno irregular e coloração basofílica (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). São as células mais numerosas na circulação sangüínea em diversas espécies de teleósteos. Os neutrófilos são células arredondadas, sendo também chamados de polimorfonucleares em função da grande variação de formas de seu núcleo excêntrico, que pode se apresentar em bastonete ou com várias segmentações. Essa célula ocorre em todas as espécies, com exceção da piapara (*Leporinus elongatus*) (SATAKE et al., 1991). São os leucócitos mais importantes no sangue periférico e apresentam elevada sensibilidade a modificações ambientais.

Os monócitos são células grandes, com cerca de duas vezes o tamanho dos eritrócitos, sendo as maiores células do sangue periférico (RANZANI-PAIVA; GODINHO, 1983; RANZANI-PAIVA, 1995a). Os monócitos são as células circulantes que quando migram para o foco lesional se diferenciam em macrófagos (MATUSHIMA; MARIANO, 1996; SADO; MATUSHIMA, 2007). Os eosinófilos são células com núcleo arredondado e excêntrico. Esse tipo celular é muito escasso ou mesmo ausente no sangue periférico de peixes teleósteos, sendo mais abundante nos tecidos hematopoiético, submucosa intestinal, líquido peritoneal, mesentério e brânquias (RANZANI-PAIVA, 1995b). Semelhante aos eosinófilos, os basófilos também se apresentam em pequena quantidade na circulação sangüínea.

Apesar de haver diversos trabalhos englobando a hematologia de peixes, pouco se conhece sobre a fisiologia do pacu no que diz respeito às características hematológicas, mesmo

---

<sup>2</sup> JAKOWSKA, S. Algunos problemas en hematologia comparada. **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v. 7, n. 2, p. 143-155, 1959.

sendo esta uma espécie de grande interesse para aquicultura (TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004). Diante da escassez de trabalhos no que se diz respeito à avaliação de imunostimulantes na nutrição de espécies nativas e sua avaliação através de exames hematológicos, o objetivo do presente estudo foi avaliar a adição de níveis crescentes de diferentes compostos com propriedades imunostimulantes na dieta sobre o desempenho e hematologia do pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

## Referências

- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 22, p. 394-402, 2007.
- ALCORN, S.W.; PASCHO, R.J.; MURRAY, A.L.; SHEARER, K.D. Effects of ration level on immune function in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Oxford, v. 217, p. 529-545, 2003.
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, vaccines, and environmental stressor in aquaculture: NBT assays to show neutrophil activity by these immunomodulators. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 7., 2004, Hermosillo. **Avances em nutrición acuícola: memórias...** Hermosillo: Sonora, 2004. p. 320-328.
- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M.G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P.G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short-and long-term effects of dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 18, p. 311-325, 2005.
- BARCELLOS, L.J.G., SOUZA S.M.G., WOEHL, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 26, n. 1, 99-111, 2000.
- BELETTI, M.E.; SILVA, M.; SANTOS, A.L.Q.; MANNA, F.D.; SOARES, J.M.; FERREIRA, C.A.Q. Ultrastructural study of thrombocytes of *Arapaima gigas*. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 14, n. 1, p. 3-10, 1998.
- BLAZER, V.S. Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 77-86, 1991.
- BONAMIN, L.V.; PAULINO, C.A. Imunofarmacologia. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Ed). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 49, p. 465-476.



- BORGHETTI, J.R.; OSTRENSKY, A. Problemas e perspectivas para a pesca e para a aqüicultura continental no Brasil. In: REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. (Ed.). **Águas doces no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Ed. Escrituras, 2002. cap. 13, p. 451-471.
- BOYDE, C.E.; QUEIROZ, J.F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Ed. TecArt, 2004. cap. 3, p. 25-44.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 19, p. 457-472, 2005.
- BRIDLE, A.R.; CARTER, C.G.; MORRISON, R.N.; NOWAK, B.F. The effect of  $\beta$ -glucan on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease – evidence of inherent resistance. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, p. 347-356, 2005.
- BURR, G.; GATLIN III, D. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 36, n. 4, p. 425-436, 2005.
- CASTAGNOLLI, N. Estado da arte da aqüicultura brasileira. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Ed. TecArt, 2004. cap. 1, p. 1-6.
- CASTAGNOLLI, N. Piscicultura intensiva e sustentável. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, 2000. cap. 5, p. 181-195.
- CATTON, W.T. Blood cell formation in certain teleost fishes. **Blood**, New York, v. 6, p. 39-60, 1951.
- CHEN, D.; AINSWORTH, A.J. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 15, p. 295-304, 1992.
- CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.J. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**, Oxford, v. 242, p. 553-569, 2004.
- CLERTON, P.; TROUTAUD, D.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; DESCHAUX, P. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and head kidney leucocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 11, p. 1-13, 2001.

COLT, J. Aquaculture production systems. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 4183-4192, 1991.

COSTA, A.B.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 281-284, 2006.

COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARIÑOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. **Aquaculture**, Oxford, v. 219, p. 99-109, 2003.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria. Editora UFSM, 2005. cap. 1, p. 23-36.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 89, p. 169-174, 2002.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 101, p. 203-210, 2004.

DANIELS, C.; BOOTHROYD, D.; DAVIES, S.; PRYOR, R.; WELLS, C. Developing & understanding the use of pre-biotics in homarid lobster culture. **Aquaculture Health International**, Manukau, v. 8, p. 32-35, 2007.

DANIELS, C.; BOOTHROYD, D.; DAVIES, S.; PRYOR, R.; TAYLOR, D.; WELLS, C. Bio-Mos<sup>®</sup> improves growth and survival of cultured lobsters. **Shellfish News**, Padstow, v. 21, p. 23-25, 2006.

DAVIS, K.B.; GRIFFIN, B.R.; GRAY, W.L. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. **Aquaculture**, Oxford, v. 214, p. 55-66, 2002.

ENG, C.T., TECH, E. Introduction and history of cage culture. In: WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W.; LIM, L.H.S. (Ed). **Diseases and disorders of finfish in cage culture**. Wallingford. CAB International, 2002. chap. 1, p. 1-40.

ESTEBAN, M.A.; CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 11, p. 3030-315, 2001.

ESTEBAN, M.A.; MULERO, V.; CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 10, p. 543-554, 2000.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2006. 162 p.

FERKET, P.R.; PARKS, C.W.; GRIMES, J.L. Mannan oligosaccharides *versus* antibiotics for turkeys. In: ALLTECH'S EIGHTEENTH ANNUAL SYMPOSIUM, 2002, Nottingham. **Nutritional biotechnology in the feed and food industry: proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 43-63.

FIGUERAS, A.; SANTARÉM, M.M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of  $\beta$ -glucans and *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 64, p. 59-68, 1998.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, p. 53-61, 1999.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, Oxford, v. 271, p. 39-46, 2007.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, Oxford, v. 180, p. 147-165, 1999.

GATLIN III, D.M. Nutrition and fish health. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish nutrition**. New York: Academic Press, 2002. chap. 12, p. 671-702.

GATLIN III, D.M.; LI, P.; WANG, X.; BURR, G.S.; CASTILLE, F.; LAWRENCE, A.L. Potencial application of prebiotics in aquaculture. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 8., 2006, Monterrey. **Avances em nutrição acuícola: memórias...** Monterrey, 2006. p. 371-376.

GENC, M.A.; AKTAS, M.; GENC, E.; YILMAZ, E. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 13, p. 156-161, 2007.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil, Subordem Characoidei**: Bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: Ed. Franciscana, 1975. v. 2, 847p.

GOUVEIA, E.M.F.; SILVA, I.S.; ONSELEM, V.J.V.; CORRÊA, R.A.C.; SILVA, C.J. Use of mannanoligosaccharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and its effects on *E. coli* inactivated in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 4, p. 23-26, 2006.

GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S.J.; GATLIN III, D.M. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharides, fructooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Oxford, v. 283, p. 163-137, 2008.

- GUTTVIK, A.; PAULSEN, B.; DALMO, R.A.; ESPELID, S.; LUND, V.; BOGWALD, J. Oral administration of lipopolysaccharides to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. Uptake, distribution, influence on growth and immune stimulation. **Aquaculture**, Oxford, v. 214, p. 35-53, 2002.
- HAMRE, K.; WAGBOO, R.; BERGE, R.K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 22, n. 1/2, p. 137-149, 1997.
- HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Oxford, v. 87, p. 1-13, 1990.
- HARRIS, J.; BIRD, D.J. Modulation of the immune system by hormones. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Philadelphia, v. 77, p. 163-176, 2000.
- HOUSTON, A.H. Review: are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 126, n. 6, p. 879-894, 1997.
- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, Edinburgh, v. 25, p. 633-642, 2002.
- JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Oxford, v. 116, p. 315-329, 1993.
- JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, Oxford, v. 222, p. 277-287, 2003.
- KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**, Hokkaido, v. 25, p. 93-98, 1990.
- KALASHNIKOVA, Z.M. On the classification of morphological elements in the blood fish. **Journal of Ichthyology**, Silver Spring, v. 3, n. 16, p. 459-472, 1976.
- KESACORDI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, Oxford, n. 274, p. 1-14, 2008.
- KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; ISHIZAKA, K.; SATOH, S.; WATANABE, T. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. **Aquaculture**, Oxford, v. 234, p. 361-379, 2004.

KODAMA, H.; HIROTA, Y.; MUKAMOTO, N.; BABA, T.; AZUMA, I. Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes by muramyl dipeptide. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 17, p. 129-140, 1993.

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

KUSUDA, R.; KAWAI, K. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. **Fish Pathology**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 221-227, 1998.

LALL, S.P. Nutrition and health of fish. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Avances em nutrição acuícola: memórias...** Mérida, 2000. p. 13-23.

LANDOLT, M.L. The relationship between diet and the immune response of fish. **Aquaculture**, Oxford, v. 79, p. 193-206, 1989.

LI, G.; GUO, Y.; ZHAO, D.; QIAN, P.; SUN, J.; XIAO, C.; LIANG, L.; WANG, H. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, Oxford, v. 253, p. 212-217, 2006.

LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D.M. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid striped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, and elevated levamisole *in vitro* impairs macrophage function. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 1380-1383, 2004.

\_\_\_\_\_. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, Oxford, v. 251, p. 201-209, 2006.

LI, Y.; WANG, Y.J.; WANG, L.; JIANG, K.Y. Influence of several non-nutrient additives on nonspecific immunity and growth of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p. 387-395, 2008.

LIN, Y.H.; SHIAU, S.Y. Dietary vitamin R requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. **Aquaculture**, Oxford, v. 248, p. 235-244, 2005a.

\_\_\_\_\_. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, Oxford, v. 244, p. 215-221, 2005b.

MAHIOUS, A.S.; GATESOUBE, F.J.; HERVI, M.; METAILLER, R.; OLLEVIER, F. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). **Aquaculture International**, London, v. 14, p. 219-229, 2006.

- MALINA, A.C.; TASSAKKA, A.R.; SAKAI, M. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune responses on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, Oxford, v. 209, p. 1-10, 2002.
- \_\_\_\_\_. Current research on the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides in fish. **Aquaculture**, Oxford, v. 25, p. 25-36, 2005.
- MACARTHUR, J.I.; THOMSON, A.W.; FLETCHER, T.C. Aspects of leukocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 27, p. 667-676, 1985.
- MATUSHIMA, E.R., MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.
- McPHEARSON, R.M.; DePAOLA, A.; ZYWNO, S.R.; MOTES Jr., M.L.; GUARINO, A.M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**, Oxford, v. 99, p. 203-211, 1991.
- MILES, D.J.C.; POLCHANA, J.; LILLEY, J.H.; KANCHANAKHAN, S.; THOMPSON, K.D.; ADAMS, A. Immunostimulation of striped snakehead *Chana striata* against epizootic ulcerative syndrome. **Aquaculture**, Oxford, v. 195, p. 1-15, 2001.
- MONTERO, D.; MARRERO, M.; IZQUIERDO, M.S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J.M.; TORT, L. Effects of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, Oxford, v. 171, p. 269-278, 1999.
- MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. *In Vitro* levamisole fails to increase seabream (*Sparus aurata* L.) phagocyte functions. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 315-318, 1998a.
- \_\_\_\_\_. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 66, p. 185-199, 1998b.
- MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MUÑOZ, J.; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 49-62, 1998.
- NEWMAN, K.E.; NEWMAN, M.C. Evaluation of mannan oligosaccharide on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, suppl. 1, p. 189, 2001.

- OLIVIER, G.; EVELYN, T.P.T.; LALLIER, R. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 9, p. 419-432, 1985.
- OLSEN, R.E.; MYKLEBUST, R.; KRYVI, H.; MAYHEW, T.M.; RINGO, E. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, p. 931-934, 2001.
- OZÓRIO, R.O.A.; AVNIMELECH, Y.; CASTAGNOLLI, N. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALLOSSI, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 2, p. 7-24.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; MAGALHÃES, A.R.M. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, 2000. cap. 6, p 197-245.
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; FIGUEIREDO, D.F.; BOIAGO, M.M.; CARVALHO, S.R.; BORDON, V.F. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 7, n. 4, p. 221-229, 2005.
- PEZZATO, L.E.; SCORVO-FILHO, J.D. Situação atual da aqüicultura na Região Sudeste. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, 2000. cap. 10, p. 303-322.
- PRYOR, G.S.; ROYES, J.B.; CHAPMAN, F.A.; MILES, R.D. Mannanligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico Sturgeon. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 65, p. 106-111, 2003.
- QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO-FILHO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture**, Baton Rouge, v. 36, n. 1, p. 45-50, Mar. 2005.
- RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Avances em nutrição acuícola: memórias...** Mérida, 2000. p. 47-56.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células sangüíneas e contagem diferencial dos leucócitos de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP (Lat. 25° 00'S – Long. 47° 55'W). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 1-22, 1995a.

\_\_\_\_\_. Hematologia de peixes. Células do sangue periférico. In: SEMANA DE HISTOLOGIA DE PEIXES, 1995, Jaboticabal. **Histologia de peixes...** Jaboticabal. Ed. Funep, 1995b. p. 1-5.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; GODINHO, H.M. Sobre células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos em curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 331-338, 1983.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, E A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.S.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Ed. Varela, 2004. cap. 4, p. 89-120.

ROCHA, R.M.; FLORES, C.Q. The ultrastructure of the hematopoietic tissue in the head kidney of matrinxã, *Brycon cephalus* Günther, 1896 (Teleostei – Characidae). **Acta Microscopica**, Caracas, v. 2, suppl. B, p. 207-208, 2001.

RODRÍGUEZ, A.; CUESTA, A.; ORTUÑO, M.A.; ESTEBAN, J.; MESEGUER, J. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 96, p. 183-192, 2003.

SADO, R.Y.; MATUSHIMA, E.R. Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e ultra-estrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus* spp.) ao BCG. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, p. 58-64, 2007. Supplement.

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

SALATI, F.; HAMAGUCHI, M.; KUSUDA, R. Immune response of red seabream to *Edwardsiella tarda* antigens. **Fish Pathology**, Hokkaido, v. 22, p. 93-98, 1987.

SAMPAIO-OLIVEIRA, A.M.B.M.; CONTE, L.; CYRINO, J.E.P. Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 8, p. 217-238.

SAMUEL, M.; LAM, T.J.; SIN, Y.M. Effect of Laminaran [ $\beta(1,3)$ -D-Glucan] on the protective immunity of blue gourami, *Thrichogaster trichopterus* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 6, p. 443-454, 1996.

SARMENTO, A.; MARQUES, F.; ELLIS, A.E.; AFONSO, A. Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 16, p. 79-92, 2004.



- SATAKE, T.; BRENTGANI, L.G.; WATANABE, L.S.; SOARES, T.R.S.; LOPES, R.A.; MARZOCHI, C. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XXV. As células sangüíneas da piapara *Leporinus elongatus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Anostomidae). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 9., 1999, Maringá. **Anais...** Maringá: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1999. p. 41.
- SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. **Methods for fish biology**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. 632 p.
- SECOMBES, C.J. Enhancement of fish phagocyte activity. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 4, p. 421-436, 1994.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 19, p. 293-306, 2005.
- \_\_\_\_\_. Adjuvant and immunostimulatory effects of  $\beta$ -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 114, p. 15-24, 2006.
- SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.
- SITJÁ-BOBADILLA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 9, p. 637-640, 1999.
- SIWICKI, A.K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 13, p. 87-91, 1989.
- SMITH, P.; HINEY, M.P.; SAMUELSEN, O.B. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. **Annual Review of Fish Diseases**, Oxford, v. 4, p. 273-313, 1994.
- SOLEM, S.T.; JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 5, p. 475-491, 1995.
- SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 205-211, 2000.

- STAYKOV, Y.; DENEV, S.; SPRING, P. Influence of dietary mannan oligosaccharides (Bio-Mos<sup>®</sup>) on growth rate and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: HOWAL, B.; FLOS, R. (Ed.). **Lessons from the past to optimize the future**. Oostende, European Aquaculture Society, 2005. p. 431-432. (Special Publication, 35).
- STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. Effect of mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, London, v. 15, p. 153-161, 2007.
- STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. 882 p.
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 157-162, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004. 144 p.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; KRONKA, S.N. Evaluation of the hematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 553-555, 1999.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIN, E.F.S.; CAMPOS-FILHO, E. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 175-184, 1999.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; MORAES, F.R.; CAMPOS-FILHO, E. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Osteichthyes: Characidae). **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 15, n. 3, p. 149-153, 1999a.
- TAVARES-DIAS, M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 693-698, 2002a.
- TAVARES-DIAS, M.; RODRIGUES, C.A.P.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; SANTANA, A.E. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2002b.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R. Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III. Parameters of hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg X *Colossoma macropomum* Cuvier) (Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 899-906, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R.; PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, n. 2, p. 337-342, 1999b.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M.J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M.S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 23, p. 969-981, 2007.

URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6, p. 171-193.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria. Editora UFSM, 2005. cap. 10, p. 225-255.

VAL, A.L., SILVA, M.N.P., VAL, V.M.F.A. Estresse em peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M.A.P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela, 2004, cap. 3, p. 75-88.

VENDEMIATTI, J.A.; COSTA, A.B.; CYRINO, J.E.P. Mananoligossacarídeos alimentares (MOS) como agentes profiláticos das infecções por *Edwardsiella tarda* em tilápia do Nilo. In: CONGRESO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2003, Zaragoza. **Anales...** Zaragoza: Universidad de Zaragoza, 2003. p. 123-140. Disponível em: <<http://www.CIVA2003.org>>. Acesso em: 15 mar. 2005.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Oxford, v. 143, p. 123-133, 1996.

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 409-424, 1998.

- WANG, S.H.; CHEN, J.C. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v.19, p. 191-204, 2005.
- WANG, Y.B.; LI, J.R.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. **Aquaculture**, Oxford, v. 281, p. 1-4, 2008.
- WELKER, T.L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P.H. Immune responses and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 38, n. 1, p. 24-35, Mar. 2007.
- WEYTS, F.A.A.; COHEN, N.; FLIK, G.; VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 9, p. 1-20, 1999.
- WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIUS, P.H. Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Oxford, v. 248, p. 217-225, 2005.
- WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, Leipzig, v. 51, p. 32-49, 1934.
- WISE, D.J.; TOMASSO, J.R.; SCHWEDLER, T.E.; BLAZER, V.S.; GATLIN III, D.M. Effect of vitamin E on the immune responses of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 5, p. 183-188, 1993.
- XU, B.; WANG, Y.; LI, J.; LIN, Q. Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, 2008. <DOI 10.1007/s10695-0800-9248-8>. Disponível em: [www.springerlink.com.w10077.dotlib.com.br/content/br83n2gx2701h2nk/fulltext.pdf](http://www.springerlink.com.w10077.dotlib.com.br/content/br83n2gx2701h2nk/fulltext.pdf). Acesso em: 18 out. 2008.
- YIN, Z.; LAM, T.J.; SIN, Y.M. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 5, p. 519-529, 1995.
- ZDUNCZYK, Z.; JUSKIEWICZ, J.; JANKOWSKI, J.; BIERDRZYCKA, E.; KONCICKI, A. Metabolic response of the gastrointestinal tract of turkeys to diets with different levels of mannan-oligosaccharide. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 903-909, 2005.

## 2 EFEITOS DA ADIÇÃO DE LEVAMISOL NA DIETA DO PACU *PIARACTUS MESOPOTAMICUS* (HOLMBERG, 1887) SOBRE AS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E DE DESEMPENHO

### Resumo

A ocorrência de surtos epizooticos em produção intensiva de peixes representa um importante problema, já que o estresse imposto nos peixes afeta de negativamente seu sistema imune. O objetivo do estudo foi determinar o efeito da inclusão de níveis crescentes de levamisol (Levamisole HCl; SIGMA<sup>®</sup>), substância sintética com propriedades imunoestimulantes, sobre os índices de desempenho e parâmetros hematológicos em juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Os peixes (55,94 g) foram aleatoriamente distribuídos em caixas (500 L; 15 peixes por caixa) e alimentados por 30 dias com as dietas experimentais (0; 50; 100; 200 e 400 mg levamisole kg<sup>-1</sup> da dieta), e por mais 15 dias com a dieta controle em um delineamento totalmente casualizado (n=4). Análise dos parâmetros hematológicos e biométricos foram realizadas. Não houve diferença significativa sobre o desempenho, mas a concentração de hemoglobina, glicose plasmática, número total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos foram influenciados ( $p < 0,05$ ) pela suplementação dietética de levamisol. O número de leucócitos e cada tipo leucocitário diminuíram ( $p < 0,05$ ) após 15 dias de tratamento. A suplementação dietética com 100 mg/kg de levamisol promoveu aumento no número de leucócitos. A administração de levamisol por mais de 15 dias causou efeitos tóxicos no tecido linfopoiético. Mais informações a respeito de tratamentos de longa duração, mecanismo de ação, efeito sobre a hematologia de peixes de água doce são necessárias para uso seguro do levamisol na aquicultura.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*; Peixe; Nutrição; Hematologia; Levamisol

### Effects of dietary Levamisole on the hematology and growth parameters of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

#### Abstract

Diseases outbreaks are a major concern in intensive fish farming, since fish are exposed to stressors which may negatively affect their physiology. This study was set out to determine effects of dietary levamisole (Levamisole HCl; SIGMA<sup>®</sup>) on performance and hematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, juveniles. Fish (55.94 g) were stocked into 24 plastic aquaria (500 L; 15 fish per aquarium) and fed for 30 days with a commercial diet with 0; 50; 100; 200; 400 and 800 mg/kg levamisole, and for extra 15 days with the control diet in a totally randomized design trial (n=4); biometrical and hematological data were then collected. No significant differences in growth parameters were recorded for either control or supplemented diets, but hematological parameters, such hemoglobin, plasma glucose, WBC and differential leukocyte count were influenced ( $p < 0.05$ ) levamisole. WBC, lymphocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils and SGC numbers decreased significantly after 15 days. Dietary levamisole at 100 mg/kg diet for 15 days increased leukocyte production in juvenile pacu. However, levamisole administration for more than 15 days caused toxicity to lymphopoietic tissues. Information about

long term administration and effects of levamisole on performance and hematology of freshwater fish are scarce and much needed for its safe use in aquaculture.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*; Fish; Nutrition; Hematology; Levamisole

## 2.1 Introdução

Sistemas intensivos de produção caracteristicamente submetem os peixes a diversos estressores, tais como baixa qualidade da água, alta densidade populacional além de todo manejo inerente ao ciclo de produção (seleção, reprodução e transporte) os quais podem afetar negativamente seu sistema imune (ESPELID et al., 1996; VAZZANA et al., 2002) e resistência às doenças (DAVIS; GRIFFIN; GRAY, 2002). Sendo assim, a possibilidade de ocorrer um surto epizootico se torna a principal preocupação em sistemas intensivos (JAH et al., 2007). Outro importante fator é o destino do peixe produzido, principalmente para o consumo humano, havendo a necessidade da adoção de Boas Práticas de Manejo (BPMs) (BOYD; SCHMITTOU, 1999; BOYD et al., 2005), seja pela redução ou até mesmo a não utilização de quimioterápicos durante o ciclo de produção ou favorecendo o uso de substâncias alternativas com propriedades imunoestimulatórias para manutenção da sanidade e resistência dos peixes, sendo uma prática ambientalmente correta (ANDERSON, 2004; CUESTA; ESTEBAN; MESEGUER, 2002; GATESOUBE, 1999; KUMARI; SAHOO, 2006; RAA, 2000). Imunoestimulantes são compostos químicos, sintéticos ou biológicos com capacidade de aumentar a resistência a doenças através do estímulo do sistema imune inespecífico e específico, principalmente quando usados como adjuvantes em vacinas (MULERO et al., 1998; RAA, 2000; SAKAI, 1999; BRICKNELL; DALMO, 2005).

O levamisol é uma droga sintética utilizada como anti-helmíntico para animais terrestres. Além de sua atividade anti-parasitária, também foram observados efeitos imunoestimulantes, como aumento da proliferação de linfócitos T, atividade fagocítica e produção de anticorpos (RENOUX, 1980). Estudos sobre a utilização da droga em peixes também foram realizados e efeitos imunoestimulantes também foram observados, tais como aumento no número de leucócitos, atividade fagocítica e lisozima sérica (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006; LI et al., 2006; MULERO et al., 1998), porém sinais de toxicidade do levamisol para peixes também foram observados (LI; WANG; GATLIN, 2004).

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, é uma das espécies de caracídeo mais produzida e de maior interesse econômico no Brasil devido ao seu hábito alimentar onívoro, altas taxas de crescimento e boa qualidade de carne, sendo assim é de se esperar cada vez mais a intensificação dos sistemas de produção da espécie (JOMORI et al., 2005). Entretanto, pouco se sabe a respeito do manejo sanitário do pacu em sistemas intensivos de produção. O presente experimento avaliou o efeito de diferentes níveis de levamisol na dieta de juvenis de pacu sobre o desempenho e variáveis hematológicas.

## 2.2 Desenvolvimento

### 2.2.1 Material e Métodos

#### *Arranjo experimental*

Espécimes juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* provenientes de piscicultura comercial, mantidos nas instalações do Laboratório de Nutrição de Peixes do setor de Piscicultura da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, foram anestesiados em solução de benzocaína (1:10.000), pesados em balança eletrônica com precisão de 0,01 g ( $55,94 \pm 2,26$  g) separados em lotes homogêneos de 15 peixes e distribuídos em 12 caixas de polietileno (1.000 L) divididas ao meio por uma tela plástica, abastecidas por um sistema fechado de recirculação de água com filtragem biológica e aeração forçada a partir de compressor radial e difusores de ar, compondo um ensaio em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos: 0,0; 50; 100; 200; 400 e 800mg de levamisol (Cloridrato de Levamisol, SIGMA<sup>®</sup>) por kg de ração (n=4). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com as dietas experimentais (08h00m e 17h00m) até aparente saciedade por 30 dias. Após esse período, todos os animais foram alimentados com a dieta controle (sem suplementação de levamisol) por mais 15 dias, seguindo o regime anteriormente descrito. As condições de temperatura, pH e oxigênio dissolvido na água foram monitoradas diariamente durante todo o período experimental.

Para elaboração das dietas, uma ração comercial (Tabela 1) foi finamente moída e homogeneizada em peneiras de 1 mm. Foram adicionados e misturados à ração os níveis de levamisol correspondente a cada tratamento. A mistura foi umedecida e granulada em moinho de

rosca sem fim. Após secagem (18 horas) em estufa de ventilação forçada (45°C), as dietas foram armazenadas em recipientes plásticos e mantidas sob refrigeração durante todo período experimental.

Tabela 1 - Composição química da dieta basal (controle) com base na matéria seca

Nutriente	%
Proteína bruta	27,28
Energia Bruta	11,44
Fibra bruta	6,27
Matéria seca	96,23
Umidade	3,77
Matéria mineral	16,31

Composição da pré-mistura vitamínica e mineral por kg de ração (Purina do Brasil Ind. Com. Ltda. Brasil): Mg 700.0 mg; Fe 100.0 mg; Cu 15 mg; Zn 200.0 mg; Mn 30 mg; I 1.0 mg; Se 0.3 mg; vitamina A 9,000 IU; vitamina D<sub>3</sub> 3,000 IU; vitamina E 112.0 IU; vitamina K 7.50 IU; Ácido fólico 7.50 mg; Biotina 0.6 mg; Colina 500.0 mg; Niacina 112.0 mg; Pantotenato de cálcio 37.0 mg; Tiamina 22.0 mg; Riboflavina 22.0 mg; Piridoxina 22.0 mg; vitamina B<sub>12</sub> 26.0 µg; vitamina C 150.0 mg

#### *Avaliação dos parâmetros de desempenho*

Aos 21, 42 e 63 dias de experimento, os peixes foram submetidos a 24 horas de jejum, anestesiados (solução de benzocaína 1:10.000), pesados e medidos. Foram calculados e registrados os seguintes parâmetros de desempenho (TACON, 1990):

- ganho de peso médio (GP)

$$GP = PF - PI$$

- índice de conversão alimentar aparente (ICA)

$$ICA = \frac{R_c}{GP}$$

onde  $R_c$  = total de alimento consumido;

- consumo diário de ração (CRD)



- taxa de crescimento específico (TCE)

$$TCE = 100 \times \frac{(\ln PF - \ln PI)}{t}$$

onde:  $PF$  = peso final (g);  $PI$  = peso inicial (g);  $t$  = período experimental (dias)

#### *Avaliação dos parâmetros hematológicos*

O perfil hematológico dos animais foi feito através de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 3mL previamente umedecidas com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (10%) em solução salina (0,6%). Foram avaliados os índices hematimétricos absolutos e suas variáveis, contagem diferencial de leucócitos, contagem total de leucócitos e trombócitos, concentração de glicose e proteína total plasmática.

#### *Estimativa da concentração de hemoglobina*

Em função da consistência dos resultados, estabilidade dos reagentes e disponibilidade comercial dos padrões, foi utilizado o método da cianometá-hemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973): 0,02mL (20 $\mu$ L) de sangue foram diluídos em 5 mL do reagente de cor da hemoglobina; após 10 minutos (completa conversão da hemoglobina em cianometá-hemoglobina) a amostra foi centrifugada a 10.000g por 15 minutos para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, o sobrenadante recolhido para leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda 540nm e os resultados expressos em g/100mL.

#### *Valor do hematócrito*

Amostras sanguíneas homogeneizadas foram introduzidas em capilares para microhematócrito e uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000g em centrífuga de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) e a avaliação feita com auxílio da tabela de microhematócrito e expressa como  $Vol_{eritrócitos} / 100cm^3$ .

### *Contagem total de eritrócitos*

Para a contagem de eritrócitos, alíquotas de sangue foram diluídas em um tubo de ensaio na proporção 0,02 mL de sangue para 4,0 mL do diluente de Natt e Herrick (1952). Após homogeneização da solução a contagem foi feita em câmara de Neubauer. Foram contados os eritrócitos contidos nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara e o resultado expresso em  $\text{Num}_{\text{eritrócitos/leucócitos}} / \text{mm}^3$ .

### *Contagem total de leucócitos e trombócitos*

Extensões sangüíneas de cada animal foram feitas em lâminas de vidro com extremidade fosca foram secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. A contagem total de leucócitos e trombócitos foi realizada pelo método indireto (MARTINS et al., 2004) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Leucócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ leucócitos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sangüínea}}$$

$$\text{Trombócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ trombócitos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sangüínea}}$$

### *Contagem diferencial de leucócitos*

Para contagem diferencial das células de defesa (leucócitos) foram realizadas três extensões sangüíneas de cada animal em lâminas com extremidade fosca. As lâminas foram então secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em

microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. Foram contadas 100 células em cada lâmina, e o resultado expresso em % de cada tipo celular (linfócito, neutrófilo, monócito, eosinófilo e célula granulocítica especial) e depois, calculados o número absoluto de cada um com relação ao número total de leucócitos observados na câmara de Neubauer (MARTINS et al., 2004).

#### *Proteína total plasmática*

Alíquotas de plasma foram separadas por centrifugação das amostras de sangue coletadas. A concentração total de proteína plasmática foi determinada através de um refratômetro portátil (WZ-301/Protein 0,0-12 g/dL).

#### *Glicose plasmática*

Alíquotas das amostras de sangue coletadas foram separadas em microtubos contendo fluoreto; o plasma foi separado por centrifugação e as amostras congeladas para posterior análise. A concentração de glicose plasmática foi determinada através do método enzimático utilizando kit laboratorial GLICOSE GOD-PAP Liquid Stable Mono – Reagente (LABORLAB<sup>®</sup>). Após descongelamento das amostras em geladeira, 10 µL de plasma foram adicionados a 1000 µL do reagente enzimático, incubados a 37 °C por 10 minutos e a absorbância da amostra lida em espectrofotômetro no comprimento de onda 505 nm; o resultado foi expresso em mg/dL.

*Volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)*

As variáveis hematimétricas VCM, HCM e CHCM foram determinadas de acordo com Wintrobe (1934) através dos seguintes cálculos:

$$\text{VCM (fL)} = \frac{\text{Htc} \times 10}{\text{Eri}}$$

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{Eri}}$$

$$\text{CHCM (g dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{Htc}}$$

onde: Htc=hematócrito, Eri=número total de eritrócitos e Hb=concentração de hemoglobina.

### *Procedimentos estatísticos*

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As variáveis que apresentaram efeito significativo dos tratamentos foram submetidas ao teste de comparação de médias de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) (STEEL; TORRIE, 1988) pelo PROC GLM SAS, (SAS INSTITUTE, 1985). Para análise da variância, algumas variáveis foram submetidas a transformações para que os valores adquirissem uma distribuição normal e homogeneidade da variância de acordo com a ferramenta SASLAB do aplicativo SAS (1985), como segue:

- concentração de glicose plasmática: logaritmo com base 10:  $\log_{10}(\text{Glic})$
- hemoglobina corpuscular média:  $\frac{1}{\text{HCM}}$
- concentração de hemoglobina corpuscular média:  $(\text{CHCM})^2$
- n<sup>o</sup> de leucócitos:  $\log_{10}(\text{Leuc})$
- n<sup>o</sup> de trombócitos:  $\log_{10}(\text{Tromb})$
- n<sup>o</sup> de linfócitos:  $\log_{10}(\text{Linf})$
- n<sup>o</sup> de monócitos:  $\log_{10}(\text{Mon})$
- n<sup>o</sup> de neutrófilos:  $\log_{10}(\text{Neu})$
- n<sup>o</sup> de eosinófilos:  $\sqrt{\text{Eos} + 0,5}$
- n<sup>o</sup> de célula granulocítica especial:  $\sqrt{\text{Cge} + 0,5}$
- ganho de peso:  $\log_{10}(\text{GP})$
- consumo de ração:  $\log_{10}(\text{CR})$
- índice de conversão alimentar:  $\log_{10}(\text{ICA})$

## 2.2.2 Resultados

### *Parâmetros de qualidade de água*

Os parâmetros de qualidade de água (Tabela 2) mensurados durante o todo experimento se encontravam dentro dos valores ideais para sobrevivência da espécie segundo Urbinati e Gonçalves (2005).

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante período experimental

Parâmetro	O <sub>2</sub> D	pH	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Condutividade	Temperatura
	mg/L		mg/L	- mV	°C
Média	6,10	8,07	0,5	60,5	27,1
Desvio Padrão	0,47	0,07	-	4,2	1,4

### *Parâmetros de desempenho*

A análise de variância não detectou efeito significativo dos tratamentos sobre os parâmetros de desempenho. A inclusão de levamisol na dieta do pacu não apresentou diferenças significativas nos parâmetros de desempenho (Tabela 3).

Tabela 3 - Ganho de peso (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de sobrevivência (TS) do pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol

Levamisol mg/kg de dieta	Individual				
	GP (g)	ICA	CR (g)	TCE (%)	TS (%)
0,0	9,86 ± 3,6	1,43 ± 0,49	13,03 ± 3,15	0,94 ± 0,29	100
50	9,34 ± 3,7	1,69 ± 0,96	13,46 ± 3,6	0,91 ± 0,35	100
100	9,27 ± 2,7	1,65 ± 0,45	14,58 ± 3,74	0,88 ± 0,27	100
200	7,82 ± 2,9	1,82 ± 1,07	12,01 ± 2,6	0,77 ± 0,28	100
400	8,72 ± 3,8	1,82 ± 1,05	13,02 ± 3,43	0,84 ± 0,37	100
800	8,57 ± 2,87	1,51 ± 0,37	12,31 ± 2,93	0,84 ± 0,29	100
ANOVA	0,723	0,690	0,655	0,762	

Análise de variância com significância ao nível de 95% ( $p < 0,05$ )

#### *Parâmetros hematológicos*

A análise de variância para os parâmetros hematológicos em relação aos tratamentos, tempos de coleta e a interação de ambos está representada na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros hematológicos de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* para os tratamentos, tempos experimentais e interação entre os tratamentos e tempos experimentais de coleta ( $\alpha=0,05$ )

Variáveis	Valor de <i>p</i> para		
	Tratamento	Tempo	Tratamento X tempo
Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	0,791	0,307	0,749
Hemoglobina (g/dL)	0,009	0,0003	0,514
Hematócrito (%)	0,327	0,314	0,195
VCM (fL)	0,869	0,412	0,392
HCM (pg/cel)	0,395	0,002	0,582
CHCM (g/dL)	0,0004	<0,0001	0,528
Proteína total (g/dL)	0,152	0,004	0,063
Glicose (mg/dL)	0,042	<0,0001	0,551
Trombócitos/ $\mu\text{L}$	0,059	0,060	0,016
Leucócitos/ $\mu\text{L}$	0,001	<0,0001	0,202
Linfócitos/ $\mu\text{L}$	0,001	<0,0001	0,342
Monócitos/ $\mu\text{L}$	0,857	<0,0001	0,804
Neutrófilos/ $\mu\text{L}$	0,089	<0,0001	0,199
Eosinófilos/ $\mu\text{L}$	0,003	0,0003	0,148
CGE/ $\mu\text{L}$	0,982	<0,0001	0,437

A suplementação dietética de levamisol influenciou significativamente os parâmetros hematológicos do pacu (Tabela 4). A concentração de hemoglobina e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) apresentaram os maiores e menores valores com a suplementação de 200 mg e 50 mg/kg de dieta, respectivamente, porém nenhum nível de suplementação foi diferente ( $p>0,05$ ) da dieta controle, sem suplementação de levamisol. A concentração de glicose plasmática foi maior nos peixes suplementados com a maior concentração de levamisol na dieta (800 mg/kg) e o menor valor nos peixes alimentados com a dieta controle (Figura 3).

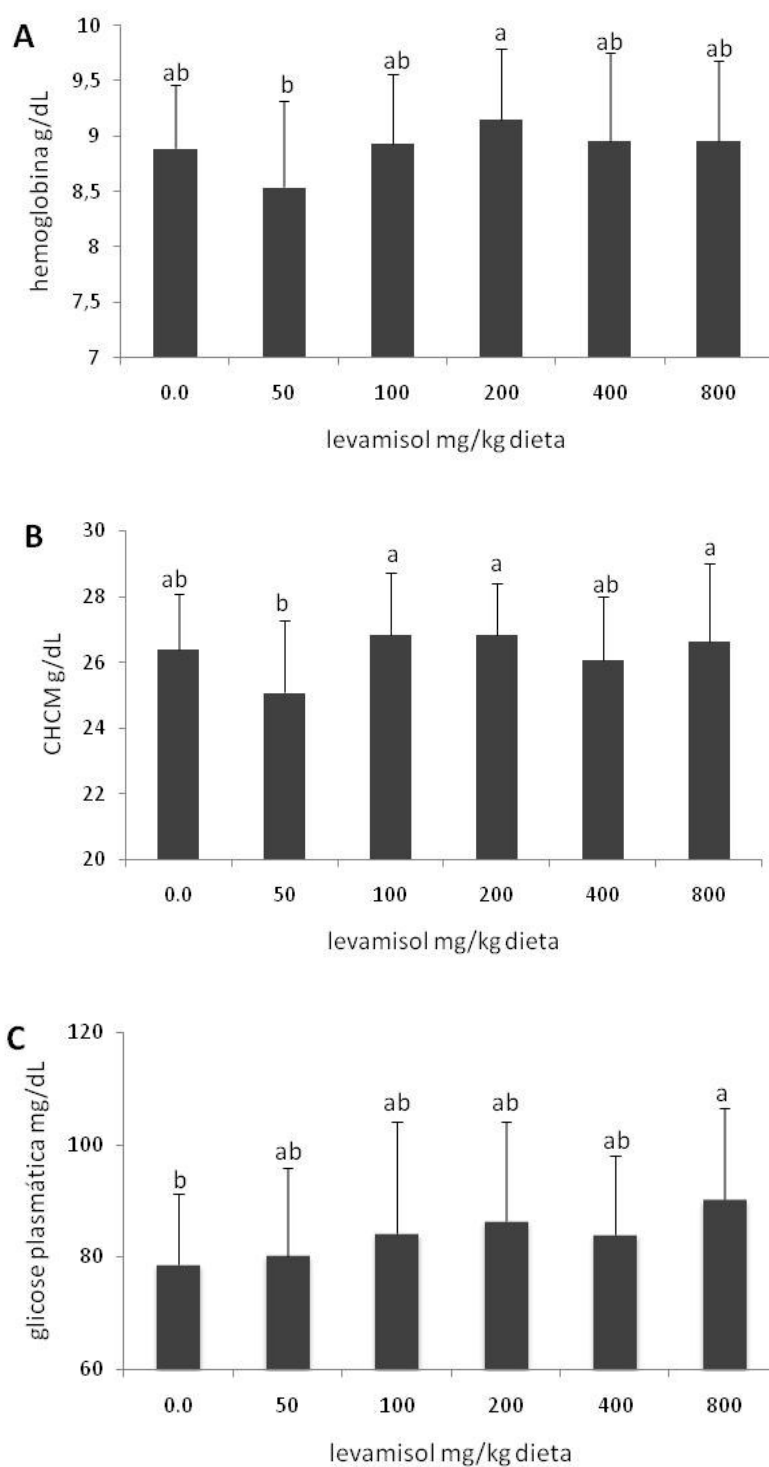


Figura 3 - Concentração de hemoglobina (A), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (B) e concentração de glicose plasmática (C) de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol na dieta ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )



O número total de leucócitos, apesar de não ter diferido da dieta controle, apresentou os maiores valores com 100 mg/kg de suplementação. Da mesma forma, na contagem diferencial de leucócitos, o número de linfócitos e eosinófilos também mostraram os maiores valores ( $p<0,05$ ) nos peixes alimentados com dietas suplementadas com 100 mg de levamisol por kg de dieta (Figura 4).

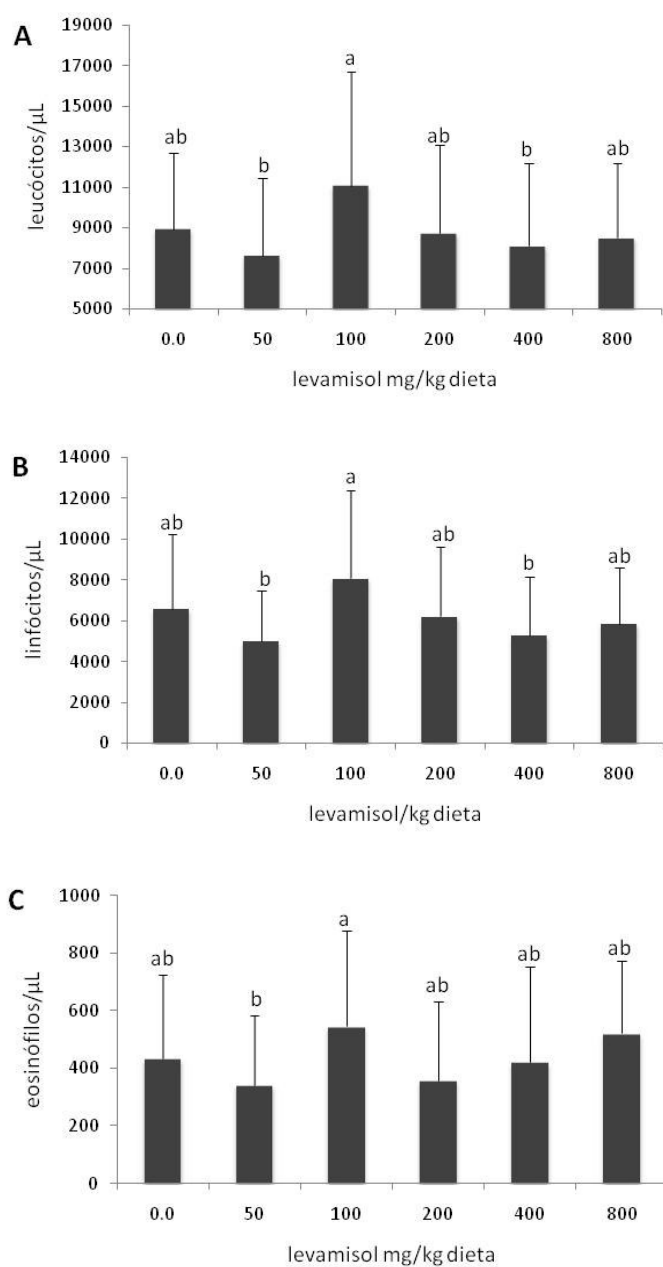


Figura 4 - Número total de leucócitos (A), linfócitos (B) e eosinófilos (C) de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol na dieta ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

Durante o período experimental, a concentração de hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) sofreram queda significativa ( $p<0,05$ ) após os 30 dias de experimento, assim como a concentração de proteína total plasmática (Figura 5).

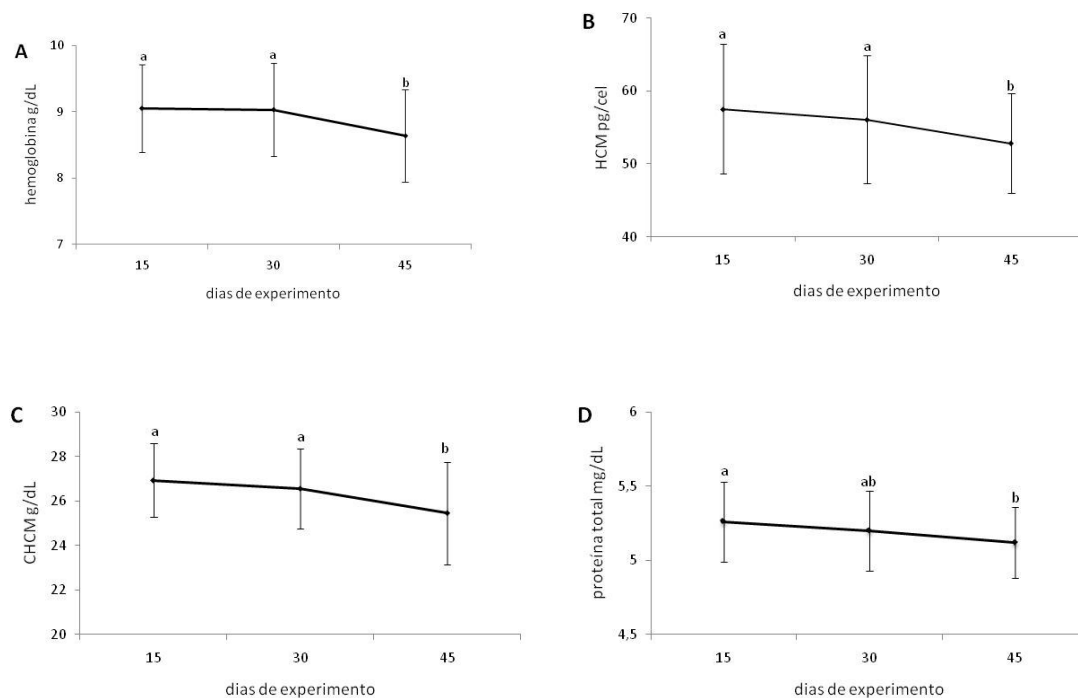


Figura 5 - Concentração de hemoglobina (A), hemoglobina corpuscular média (B), concentração de hemoglobina corpuscular média (C) e proteína total plasmática (D) de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* aos 15, 30 e 45 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada ponto denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

O número total de leucócitos e a contagem diferencial dos leucócitos também apresentaram queda significativa ( $p < 0,05$ ) no decorrer do experimento (Figura 6).

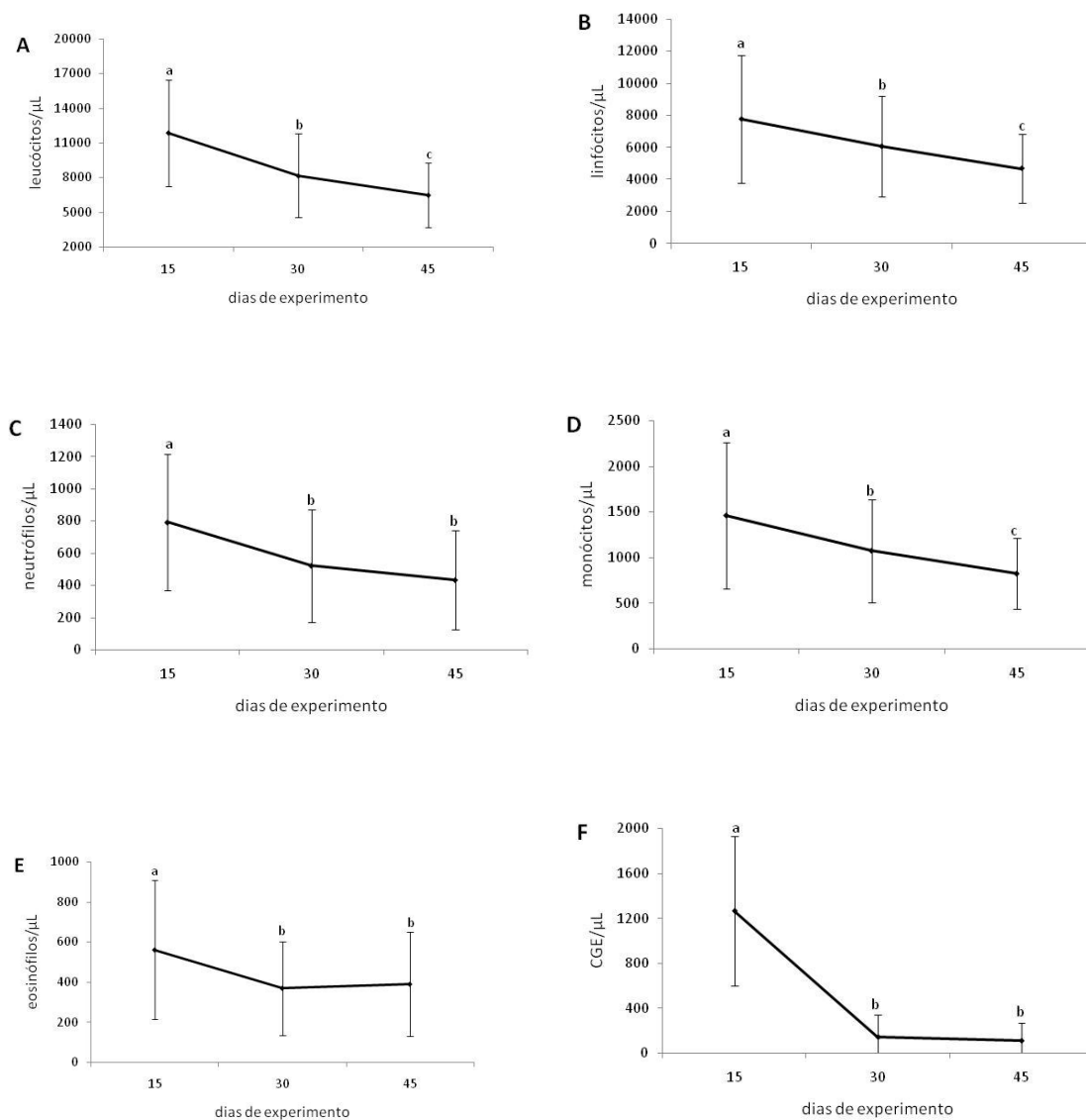


Figura 6 - Número total de leucócitos (A), linfócitos (B), neutrófilos (C), monócitos (D), eosinófilos (E) e células granulocíticas especiais (CGE) (F) de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* aos 15, 30 e 45 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada ponto denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

Entretanto, para a concentração de glicose plasmática o comportamento dos dados observado foi o oposto, ou seja, houve aumento significativo no decorrer do período experimental (Figura 7).

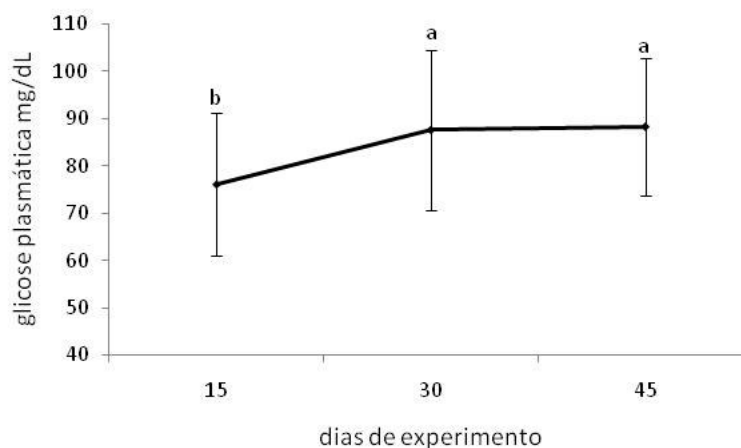


Figura 7 - Concentração de glicose plasmática de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* aos 15, 30 e 45 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ). Diferentes letras acima de cada ponto denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

O número de trombócitos apresentou interação significativa entre tratamento e os tempos experimentais (Tabela 4). Aos 15 dias de experimento, dietas suplementadas com 100 mg/kg de levamisol proporcionaram os maiores valores no número de trombócitos, sendo os menores determinados nas dietas sem suplementação de levamisol (Figura 8). Nos peixes alimentados com dietas contendo 100mg e 400mg de levamisol por kg de ração apresentaram queda significativa do número de trombócitos no decorrer do experimento (Figura 9).

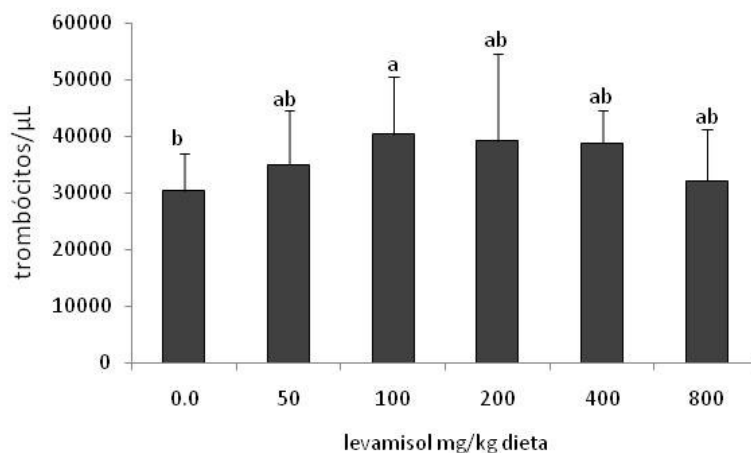


Figura 8 - Número total de trombócitos de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de levamisol na dieta ( $\mu \pm DP$ ) aos 15 dias de experimento. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

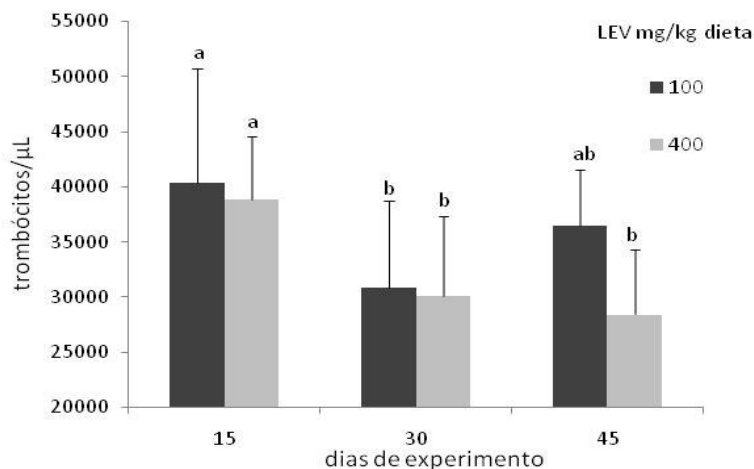


Figura 9 - Número total de trombócitos de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* aos 15, 30 e 45 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ), suplementados com 100mg e 400mg de levamisol. Diferentes letras acima das respectivas colunas denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

### 2.2.3 Discussão

Melhor desempenho e a maior resistência dos peixes à doenças são objetivos primordiais na aquicultura. Neste estudo, os índices de desempenho não apresentaram efeito da adição de levamisol (LEV) na dieta. Em concordância com os resultados obtidos, juvenis de cobia *Rachycentrom canadum* suplementados por 15 dias com 500 e 1.000 mg de levamisol por kg de dieta não apresentaram maior ganho de peso em relação aos peixes que receberam a dieta sem

levamisol (LEAÑO et al., 2004). No entanto, Mulero et al. (1998) observaram melhora significativa no ganho de peso e crescimento em douradas *Sparus aurata* suplementados por 10 dias com 125 mg de levamisol por kg de dieta. Li; Wang e Gatlin (2006) também obtiveram melhora no ganho de peso do robalo híbrido (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) com dietas contendo 100 e 250mg LEV kg<sup>-1</sup> dieta por um período de três semanas quando comparados com a dieta controle.

Por ser um anti-helmíntico, acreditava-se que a melhora dos índices de desempenho trazida pelo levamisol era consequência da remoção dos parasitas e melhor aproveitamento dos nutrientes, porém Cabaj et al. (1995) estudaram a ação do levamisol no desempenho de ovelhas e também observaram melhora no ganho de peso desses animais, mas estes estavam insento de parasitismo, descartando essa hipótese. A maioria dos estudos realizados são voltados à avaliação dos efeitos do levamisol sobre o sistema imune dos peixes (CUESTA; ESTEBAN; MESEGUER, 2002; CUESTA; MESEGUER; ESTEBAN, 2004; LI et al., 2006), sendo escassos os relacionados com as variáveis hematológicas. Em peixes, a presença, a quantidade e proporção das diferentes células no sangue periférico refletem o estado fisiológico do animal num dado momento ou período da vida (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). A inclusão de levamisol na dieta do pacu influenciou a concentração de hemoglobina e o CHCM, apresentando os maiores valores com 200 mg de levamisol por kg de dieta e os menores, com 50 mg de suplementação, porém sem qualquer diferença significativa quando comparados ao tratamento controle e se encontravam dentro dos valores normais para espécie (RANZANI-PAIVA et al., 1998/1999; TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004).

O hematócrito representa o percentual do volume de sangue correspondente aos glóbulos vermelhos e seu aumento pode ser relacionado a condições estressantes (BARTON, 2000; BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006) juntamente com parâmetros imunológicos e bioquímicos como a concentração de glicose plasmática (URBINATI; CARNEIRO, 2001). Menores valores do hematócrito foram observados em douradas suplementados com levamisol (MULERO et al., 1998). Os níveis de suplementação de levamisol não influenciaram os valores de hematócrito no presente estudo. Em concordância com os resultados obtidos, robalos híbridos (LI; WANG; GATLIN, 2006), *rohu* (SAHOO; MUKHERJEE, 2001) e trutas arco-íris (ISPIR; DÖRÜCÜ, 2005) suplementados com levamisol na dieta não apresentaram diferenças significativas no valor do hematócrito.

A resposta endócrina ao estresse é caracterizada pela hipersecreção de catecolaminas e cortisol, o que induz a rápida mobilização das reservas energéticas (VIJAYAN; LEATHERLAND, 1989; VIJAYAN; PEREIRA; MOON, 1994). Foi registrada diferença estatística na concentração de glicose plasmática, o qual foi maior nos peixes alimentados com a dieta contendo o maior nível de inclusão de levamisol enquanto que o menor valor foi observado nos peixes alimentados com a dieta controle. Também houve aumento significativo da concentração da glicose plasmática no decorrer do período experimental. Alterações hematológicas em decorrência de fatores estressantes podem gerar um processo de hemoconcentração ou hemodiluição. Durante o período experimental houve queda significativa nos valores de hemoglobina, HCM, CHCM, proteína total e número total de leucócitos, assim como na contagem diferencial de leucócitos.

O quadro hematológico em uma situação de estresse é variável, e depende da espécie estudada. O tambaqui *Collossoma macropomum* responde com aumento (AFFONSO et al., 2003; GOMES et al., 2003) e queda nos valores de hemoglobina, sem alteração do CHCM (TAVARES-DIAS et al., 2001) e até mesmo sem alteração na concentração de hemoglobina e aumento da CHCM (CHAGAS et al., 2002). O tambacu *C. macropomum* x *P. mesopotamicus* responde com aumento da hemoglobina (MARTINS et al., 2002) e a matrinxã *Brycon cephalus*, pode responder com aumento do CHCM e hemoglobina (CARNEIRO, 2001). A mesma variedade de respostas também ocorre com relação às células de defesa orgânica. Pode haver aumento no número de leucócitos em tambaquês (TAVARES-DIAS et al., 2001) e no híbrido tambacu (MARTINS et al., 2002). O número de trombócitos pode diminuir ou não sofrer alterações, como ocorrido para o pacu (MARTINS et al., 2000) e para o tambacu (MARTINS et al., 2002). Para a contagem diferencial dos leucócitos, também pode haver aumento ou queda no número de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos.

A concentração de proteína total não revelou efeito dos tratamentos, assim como observado por Sahoo e Mukherjee (2001) em *rohu* suplementados com 5 mg de levamisol por kg de peso vivo. Porém, a concentração de proteína total plasmática no presente estudo sofreu decréscimo no decorrer do experimento. A proteína plasmática também pode ser relacionada a uma série de fatores estressantes (PANKHURST; DEDUAL, 1994). Porém, Wells e Pankhurst (1999) não definiram qualquer relação entre as concentrações de proteína plasmática e estresse de captura e densidade em trutas arco-íris. Da mesma forma, no presente trabalho não foi possível

determinar as causas do comportamento dos dados. Dada a infinidade de respostas hematológicas encontradas em decorrência de fatores estressantes e sua variação dependente da espécie estudada e tipo de estímulo, somado aos resultados encontrados, foi descartada a possibilidade de um quadro de estresse dos animais, seja por manejo de coleta ou das instalações experimentais aonde os animais foram mantidos.

É comum a presença de leucócitos na circulação periférica, já que microrganismos com potencial patogênico se apresentam em maior número por unidade de volume de água (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). O número de leucócitos foi maior ( $p < 0,05$ ) nos peixes suplementados com 100mg de levamisol. Em concordância com nossos resultados, Siwicki (1989) também observou aumento da produção de leucócitos em carpas *Cyprinus carpio* suplementadas com 2 a 8mg de levamisol por kg de peso vivo. A injeção intraperitoneal de levamisol na dose de 5 mg/kg de peso vivo (ISPIR; DÖRÜCÜ, 2005) e banho na concentração de 5 µg/mL por 30 minutos (JENEY; ANDERSON, 1993) também levaram a maior produção de leucócitos em trutas arco-íris. Entretanto Sahoo e Murkherjee (2001) não observaram aumento no número de leucócitos em *rohu* suplementados com levamisol na dieta.

Ao realizar o desdobramento da interação observado no número total de trombócitos, foi constatado o maior número de trombócitos ( $p < 0,05$ ) nos peixes suplementados com 100 mg de levamisol na dieta e o decréscimo em seu valor no decorrer do período experimental nas dietas correspondentes a 100 e 400mg de suplementação de levamisol. Os trombócitos são responsáveis pela homeostasia sanguínea, de modo análogo às plaquetas em mamíferos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Além da função homeostática, os trombócitos participam de processos mórbidos (STOSKOPF, 1993) e reduzem a predisposição a infecções (KOZINSKA; ANTYCHOWICZ; KOSTRZEWA, 1999). A presença de trombócitos em exudatos inflamatórios (MARTINS, 2000; MATUSHIMA; MARIANO, 1996), presença de substâncias envolvidas no processo de fagocitose, como a fosfatase ácida (NAKAGHI et al., 1995), glicogênio (CARVALHO, 2002; NAKAGHI et al., 1995; VEIGA et al., 2002), capacidade de aderência a *Aeromonas hydrophila* (KOZINSKA; ANTYCHOWICZ; KOSTRZEWA, 1999) e fagocitose (AFFONSO, 2006) levam a crer na sua efetiva participação nos mecanismos de defesa.

Os meios pelos quais o levamisol atua sobre o sistema imune ainda não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que as células-alvo sejam os linfócitos, principal células citotóxicas envolvidas na defesa contra protozoários e vírus (RENOUX, 1980). Em peixes, alguns trabalhos



levam a crer também que a célula-alvo é o linfócito. Em *Sparus aurata* a utilização de levamisol na dieta ocasionou aumento nas funções fagocitárias e produção de linfocinas por linfócitos (MULERO et al., 1998). Utilizando a mesma espécie, Mulero, Esteban e Meseguer (1998) estudaram os efeitos *in vitro* do levamisol em fagócitos da porção cefálica do rim sendo que não foi observado estímulo das funções fagocíticas como migração e *burst* oxidativo, ou seja, a melhora das funções fagocíticas determinado anteriormente por Mulero et al. (1998) poderiam ser devido ao estímulo dos linfócitos que aumentariam a produção de linfocinas, os quais atuariam diretamente sobre os fagócitos (MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998). Posteriormente, Cuesta, Esteban e Meseguer (2002) estudaram os efeitos do levamisol sobre a atividade natural citotóxica de leucócitos do rim cefálico *in vitro* e *in vivo* de *Sparus aurata*, na qual houve aumento da atividade dessas células somente nos animais suplementados com levamisol na dieta. Células citotóxicas naturais são produzidas por linfócitos enquanto que as atividades fagocíticas são determinadas por células que não são linfócitos.

Não foram determinados parâmetros imunológicos como a atividade citotóxica natural, porém certa relação pode ser inferida, já que foi observado na contagem diferencial de leucócitos um maior número de linfócitos ( $p < 0,05$ ) nos peixes suplementados com 100 mg de levamisol por kg de dieta. O aumento no número desse leucócito representa um melhor status imunológico, já que os linfócitos de peixes são considerados células hematopoiéticas multipotenciais e imunocompetentes (ELLIS, 1977<sup>3</sup> apud RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004), com capacidade de apresentar imunoglobulinas em sua superfície (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), conferindo proteção contra infecção por parasitas (YAMAMOTO et al., 2001).

No decorrer do período experimental foi observada queda significativa no número total de leucócitos e de cada tipo leucocitário (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e células granulocítica especial) a partir dos 15 dias de experimentação. O estresse de manejo e coleta de material biológico como causadores desse quadro leucocitário foi descartado, como discutido anteriormente, e apesar do aumento da concentração de glicose plasmática representar uma forma indireta de avaliação do estado de estresse dos animais, os resultados encontrados no estudo não possibilitam tal afirmação, já que não houve queda nos índices de desempenho dos peixes.

---

<sup>3</sup> ELLIS, A.E. The leucocytes of fish: a review. **Journal of Fish Biology**, London, v. 11, p. 453-491, 1977.

Mesmo não sendo em função do manejo e instalações experimentais, tal comportamento pode levar a efeitos deletérios aos peixes, visto que a queda na quantidade desses leucócitos pode representar uma menor capacidade de responder a possíveis patógenos e que os granulócitos e fagócitos mononucleares têm importante papel no sistema imune inespecífico (DALMO; INGEBRIGTSEN; BOGWALD, 1997). Os neutrófilos representam os leucócitos com maior importância nos peixes, pois mostram elevada sensibilidade às modificações do meio ambiente (MAHAJAN; DHEER, 1979). Sua principal função consiste em fagocitar microorganismos (principalmente bactérias) e substâncias exógenas, degradá-la e destruí-las (ZINKL; KABBUR, 1997), o qual foi demonstrado em trutas arco-íris submetidos à injeção intraperitoneal com adjuvante incompleto de Freund e bactérias inativadas (*Yersinia ruckeri*) e que, de 24-48h após injeção a quantidade de neutrófilos aumentou em cerca de 500 vezes no exudato inflamatório (AFONSO et al., 1998) Os monócitos são células com capacidade fagocítica e possuem a capacidade de migrar dos vasos sanguíneos para o foco inflamatório se diferenciando em macrófagos (MATUSHIMA; MARIANO, 1996; SADO; MATUSHIMA, 2007). A função dos eosinófilos em peixes ainda não está realmente esclarecida, porém acredita-se que sua presença em maior número pode estar relacionada à espécie (TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004) infestações parasitárias (RANZANI-PAIVA; ISHIKAWA; CELIBERTO, 1987; RANZANI-PAIVA et al., 1998/1999). Da mesma forma, a célula granulocítica especial está presente em baixo número na circulação periférica de peixes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Com relação a esse tipo celular, vários autores a denominam de maneiras diferentes. Pode ser classificada como granulócito tipo II (IMAGAWA et al., 1989), neutrófilo tipo II (VEIGA et al., 2002), célula reticular (MOURA; FARIAS; VAL, 1994) e com a denominação adotada no presente estudo, célula granulocítica especial (RANZANI-PAIVA et al., 1998/1999; RANZANI-PAIVA et al., 2003; TAVARES-DIAS et al., 1999) ou leucócito granular PAS-positivo (TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2004). Sua função também não foi completamente elucidada, porém a presença de glicogênio no citoplasma dessas células (TAVARES-DIAS et al., 2004; VEIGA et al., 2002) o qual é associado ao fornecimento de energia para realização de fagocitose e reação positiva à mieloperoxidase (VEIGA et al., 2002) são indicativos de que a célula possa ter propriedades bactericida e imunomoduladora.

Essa queda no número de leucócitos e também na contagem diferencial a partir dos 15 dias de tratamento pode refletir o início de um quadro de toxicidade do levamisol no processo de

leucopoiese, devido ao tempo de administração que pode ser considerado longo a partir dos 15 dias de acordo com os resultados obtidos. É preciso especial atenção na utilização desse composto químico, já que seu efeito é dose e tempo-dependente, ou seja, altas doses podem ocasionar toxicidade, caracterizado por um quadro de imunossupressão, assim como subdosagens podem não ser eficientes (LI; WANG; GATLIN, 2004; MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998). Altas doses de levamisol (1000 mg/kg de dieta) ministrados por três a quatro semanas, causaram efeitos deletérios nos índices de desempenho do robalo híbrido (LI; WANG; GATLIN, 2004, 2006). Peixes da espécie *Clarias fuscus* suplementados com 600 mg de levamisol por kg de dieta apresentaram estímulo da atividade imunológica após sete dias de tratamento, porém posteriormente esse efeito foi decrescendo chegando a mostrar efeitos imunossupressivos com oito semanas pós-tratamento (LI et al., 2006). Estudos *in vitro* também mostraram efeitos negativos do levamisol sobre a atividade de macrófagos (*burst* oxidativo) de douradas *Sparus aurata*, incubados por 48 horas em concentrações maiores que 10 ng de levamisol/mL (MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998) e produção de formas reativas do oxigênio de leucócitos do robalo híbrido (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) incubados por 24 horas com concentrações de 1000µg/mL (LI; WANG; GATLIN, 2004).

O uso do levamisol como adjuvante em vacinação de peixes também causou alteração em nível histológico no tecido branquial de salmão do Atlântico *Salmo salar* vacinados por meio de imersão ou via intraperitoneal. Foram observadas lesões histopatológicas como fusão e hiperplasia das lamelas branquiais, assim como aumento nas células de muco, sendo esses achados relacionados ao uso do levamisol que estaria atuando sinergicamente com as bactérias da vacina no processo de irritação do tecido branquial quando utilizado na forma de banho (MORRISON; NOWAK; CARSON, 2001).

A presença de diversos trabalhos a respeito do uso de levamisol como imunoestimulante na produção de peixes mostram diferentes resultados, muitas vezes conflitantes, com relação à dosagem capaz de trazer benefícios. Segundo Mulero et al. (1998) essas diferenças provêm da utilização de diversos métodos de administração, idade, status imunológico, além da variação intra e interespecífica. Da mesma forma, Sakai (1999) enfatiza a importância da dose e tempo de administração de imunoestimulantes para sua eficácia.

## 2.3 Conclusão

A suplementação de levamisol na dieta do pacu apresentou eficácia tempo e dose dependentes, sendo que sua utilização de forma estratégica, na dose de 100 mg/kg de levamisol na dieta por 15 dias pode trazer benefícios ao animal. Porém, na atual situação, informações e estudos referentes ao uso do levamisol como suplemento na dieta do pacu são necessários, já que informações sobre os mecanismos de ação da droga sobre o ganho de peso, parâmetros hematológicos, acúmulo nos tecido e efeitos tóxicos ainda são escassas para garantir a segurança na sua utilização na aqüicultura.

## Referências

- AFFONSO, S.F. **Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo.** 2006. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- AFFONSO, E.G.; PAULA, A.A.; WAICHMAN, A.V.; FIM, J.D.I. Blood parameters in the Amazon tambaqui (*Colossoma macropomum*) to stocking density in intensive culture. IN: WORD AQUACULTURE SOCIETY, 2003, Salvador. **Anais... Salvador:** Editora WAS, 2003. p. 17.
- AFFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A.E.; SILVA, M.T. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 34, p. 27-37, 1998.
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, vaccines, and environmental stressor in aquaculture: NBT assays to show neutrophil activity by these immunomodulators. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 7., 2004, Hermosillo. **Avances em nutrición acuícola: memórias...** Hermosillo, 2004. p. 320-328.
- BARTON, B.A. Stress. In: STICKNEY, R.R. (Ed). **Encyclopedia of aquaculture.** New York: Wiley, 2000. p. 892-898.
- BLAXHALL, P.C.; DAISLEY, K.W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, p. 771-781, 1973.

- BOYD, C.E.; SCHMITTOU, H.R. Achievement of sustainable aquaculture through environmental management. **Aquaculture Economics & Management**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 59-69, 1999.
- BOYD, C.E.; McNEVIN, A.A.; CLAY, J.; JOHNSON, H.M. Certification issues for some common aquaculture species. **Reviews in Fisheries Science**, London, v. 13, p. 231-279, 2005.
- BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.V.; CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 19, p. 457-472, 2005.
- CABAJ, W.; STANKIEWICZ, M.; JOMAS, W.E.; MOORE, L.G. Levamisole and its influence on the immune responses of lambs. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 19, p. 17-26, 1995.
- CARNEIRO, P.C.F. **Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae)**. 2001. 137 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2001.
- CARVALHO, V.A.L. **Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sangüíneos e ultra-estruturais de trombócitos e granulócitos do surubim cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) Osteichthyes, Siluriformes**. 2002. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.
- CHAGAS, E.C.; LOURENÇO, J.N.P.; GOMES, L.C.; VAL, A.L. Características hematológicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) em tanques redes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12., 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Abraq, 2002. p. 272.
- CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 89, p. 169-174, 2002.
- CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 101, p. 203-210, 2004.
- DALMO, R.A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-specific defence mechanism in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 20, p. 241-273, 1997.

- DAVIS, K.B.; GRIFFIN, B.R.; GRAY, W.L. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. **Aquaculture**, Oxford, v. 214, p. 55-66, 2002.
- ESPELID, S.; LOKKEN, G.B.; STEIRO, K.; BOGWALD, J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 6, p. 95-110, 1996.
- GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, Oxford, v. 180, p. 147-165, 1999.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 56, p. 35-39, 1971.
- GOMES, L.C.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPPARI, A.R.; LOPES, N.P.; URBINATI, E.C. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Collossoma macropomum*. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 34, n. 1, p. 76-84, 2003.
- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effect of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, Oxford, v. 255, p. 179-187, 2006.
- IMAGAWA, T.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; KON, Y.; KUDO, N.; SUGIMURA, M. Morphology of Blood Cells in Carp (*Cyprinus carpio* L.). **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 51, n. 6, p. 1163-1172, 1989.
- ISPIR, Ü.; DÖRÜCÜ, M. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, Ankara, v. 29, p. 1169-1176, 2005.
- JAH, A.K.; PAL, A.K.; SAHU, N.P.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S.C. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA,  $\omega$ -3 fatty acid and  $\beta$ -carotene in *Catla catla* juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 23, p. 917-927, 2007.
- JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 3, p. 51-58, 1993.
- JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MARTINS, M.I.E.G.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, Oxford, v. 243, p. 175-183, 2005.

- KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. Relationship between the trombocyte activity and the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different seasons. **Bulletin of Veterinary Institute of Pulaway**, Pulaway, v. 43, p. 63-69, 1999.
- KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian Catfish (*Clarias batrarchus*) to several immunostimulants. **Aquaculture**, Oxford, v. 225, p. 133-141, 2006.
- LEAÑO, E.M.; GUO, J.J.; CHANG, S.L.; LIAU, I.C. Levamisole enhances non-specific immune response of cobia, *Rachycentron canadum*, fingerlings. **Journal of the Fisheries Society of Taiwan**, Keelung, v. 30, n. 4, p. 321-330, 2004.
- LI, G.; GUO, Y.; ZHAO, D.; QIAN, P.; SUN, J.; XIAO, C.; LIANG, L.; WANG, H. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, Oxford, v. 253, p. 212-217, 2006.
- LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D.M. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid striped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, and elevated levamisole *in vitro* impairs macrophage function. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 1380-1383, 2004.
- \_\_\_\_\_. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, Oxford, v. 251, p. 201-209, 2006.
- MAHAJAN, C.L.; DHEER, J.C. Cell types in the peripheral blood of an air-breathing fish *Channa punctatus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 14, p. 481-487, 1979.
- MARTINS, M.L. **Efeito da suplementação com vit. C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados**. 2000. 130 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B. Falha na resposta do cortisol estresse por captura por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, n. 2, p. 545-552, 2000.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; NOMURA, D.T.; FENERICK, J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 195-204, 2002.

- MARTINS, M.L.; PILARSKI, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr, J.; RIBEIRO, K.; MIYAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.
- MATUSHIMA, E.R., MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.
- MORRISON, R.N.; NOWAK, B.F.; CARSON, J. The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Oxford, v. 195, p. 23-33, 2001.
- MOURA, M.A.F.; FARIAS, I.P.; VAL, A.L. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 1589-1598, 1994.
- MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. *In Vitro* levamisole fails to increase seabream (*Sparus aurata* L.) phagocyte functions. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 315-318, 1998.
- MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MUÑOZ, J.; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 49-62, 1998.
- NAKAGHI, L.S.O.; AZEVEDO, C.; PELLIZON, C.H.; ROSA, L.C.; LUNARDI, L.O. Localização ultraestrutural de fosfatase ácida e peroxidase em trombócitos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: SANTOS, H.S.L. (Ed.). **Histologia de peixes**. São Paulo: UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1995. 126p.
- NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, Champaign, v. 31, p. 735-738, 1952.
- PANKHURST, N.W.; DEDUAL, M. Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate, gonadal steroids in a natural population of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 1013-1025, 1994.
- RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Avances em nutrição aquícola: memórias...** Mérida, 2000. p. 47-56.



- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, E.A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.S.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. cap. 4, p. 89-120.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; CELIBERTO, R.J. Hematologia da carpa *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfonato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2-tricoetilo (Neguvon). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 14, p.83-92, 1987.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L.; VEIGA, M.L.; EIRAS, A.C.; CAMPOS, B.E.S. Differential leukocyte counts in “Dourado”, *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu river, Pirassununga, SP. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 63, n. 3, p. 517-525, 2003.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, F.A.; EIRAS, J.C.; EIRAS, A.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A.C. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 77-83, 1998/1999.
- RENOUX, G. The general immunopharmacology of levamisole. **Drugs**, Auckland, v. 19, p. 89-99, 1980.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantã**, São Paulo, v. 20, p. 329-334, 1947.
- SADO, R.Y.; MATUSHIMA, E.R. Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e ultra-estrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus* spp.) ao BCG. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, p. 58-64, 2007. Supplement.
- SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Dietary intake levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of healthy and aflatoxin-induced immunocompromised rohu, *Labeo rohita*. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 11, n. 4, p. 15-24, 2001.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Oxford, v. 172, p. 63-92, 1999.
- SAS INSTITUTE. **Statistical guide for personal computers**. 5<sup>th</sup> ed. Cary, 1985. 956p.
- SIWICKI, A.K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 13, p. 87-91, 1989.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 569 p.

STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. 882 p.

TACON, A.G.J. **Standard methods for the nutrition of farmed fish and shrimp**. Seattle: Argent Laboratories Press, 1990. 208 p.

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

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 157-162, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 43-48, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; SANDRIN, E.F.S.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Células sangüíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenosomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 73-80, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R.; PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anastomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, n. 2, p. 337-342, 1999.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleost: Characidae) to transport stress under influence benzocaína. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, Calcutta, v. 16, n. 1, p. 75-85, 2001.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. cap. 10, p. 225-255.

VAZZANA, M.; CAMMARATA, M.; COOPER, E.L.; PARRINELLO, N. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. **Aquaculture**, Oxford, v. 210, p. 231-243, 2002.

VEIGA, M.L. ; EGAMI, M.I. ; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). **Revista Chilena de Anatomia**, Temuco, v. 18, n. 2, p. 245-250, 2002.

VIJAYAN, M.M.; LEATHERLAND, J.F. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). **Canadian Journal of Zoology**, Toronto, v. 67, p. 2746-50, 1989.

VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, M.C.; MOON, T.W. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 108C, p. 321-329, 1994.

WELLS, R.M.; PANKHURST, N.W. Evaluation of simple instrument for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 30, n. 2, p. 276-283, 1999.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, Leipzig, v. 51, p. 32-49, 1934.

YAMAMOTO, K.; MUKAMOTO, M.; WATARAI, S.; KODAMA, H.; NAKAYASU, C.; OKAMOTO, N. Induction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cell in carp (*Cyprinus carpio*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, p. 599-603, 2001.

ZINKL, J.G.; KABBUR, M. Neutrophil function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup> ed. Washington: Academic Press, 1997. chap. 11, p. 285-302.

### **3 EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA E NA DIETA DE JUVENIS DE PACU *PIARACTUS MESOPOTAMICUS* (HOLMBERG, 1887) SOBRE OS PARÂMETROS DE DESEMPENHO E HEMATOLOGIA**

#### **Resumo**

Nos sistemas intensivos de produção o alimento é proveniente da dieta artificial, já que a oferta de alimento natural é escassa ou inexistente. A ocorrência de desbalanços ou deficiências nutricionais ocasionadas por dietas mal formuladas podem acarretar em perdas de produtividade, surtos de doença e menor retorno econômico. Juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* foram alimentados com dietas semi-purificadas contendo níveis crescentes (zero; 25; 50; 150; 300 e 600 mg/kg de ração) de vitamina E (DL- $\alpha$ -tocoferil acetato) durante 63 dias compondo um delineamento totalmente casualizado (n=4) e os efeitos sobre o desempenho e parâmetros hematológicos foram avaliados. Foi observado o maior ganho de peso e crescimento específico ( $p < 0,05$ ) em peixes alimentados com dietas contendo 150 mg vit E/kg de ração e por meio da regressão segmentada o melhor nível foi estabelecido em 82,7mg/kg e 76,97 mg/kg, respectivamente. Não foi observado diferenças ( $p > 0,05$ ) no número total de células de defesa orgânica e contagem diferencial de leucócitos. A análise da série vermelha e bioquímica apresentou os maiores valores ( $p < 0,05$ ) para hematócrito e número de eritroblastos e proteína total plasmática na dieta sem suplementação de vit E. A suplementação de vitamina E em dietas artificiais para o pacu é essencial para o pleno crescimento e desenvolvimento, assim como para manutenção dos parâmetros hematológicos dentro dos valores estabelecidos para a espécie.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*; Peixe; Hematologia; Nutrição; Vitamina E

**Effect of different levels of dietary vitamin E on the hematology and growth parameters of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).**

#### **Abstract**

Intensive fish production systems are characterized by 100% of artificial feeding. Nutritional imbalance or deficiencies may lead to diseases outbreaks and economic losses. This study was set out to determine the effects of vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate) supplementation (0.0; 25; 50; 150; 300 and 600 mg/kg diet) on growth and hematological variables of juvenile pacu. Fish were fed for 90 days until apparent satiation twice a day in a completely randomized design trial (n=4). Biometrical and hematological data were collected and analyzed. Fish fed with 150 mg vit E per kg diet showed better weight gain and specific growth rate; using the broken line model technique the best levels were determined to be 82.7 and 76.97 mg/kg diet, respectively. Hematocrit, erythroblast number and total plasma protein increased ( $p < 0.05$ ) in fish fed with no vitamin E supplementation. Vitamin E supplementation in artificial diets for pacu is essential for growth and maintenance of normal hematological values determined for the specie.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*; Fish; Hematology; Nutrition; Vitamin E

### 3.1 Introdução

Segundo Naylor e Burke (2005) o consumo global de peixes duplicou desde a década de 70 e continua crescendo. Nos países da América Latina, acompanhando esse crescimento, ocorre uma tendência de aumento na produção aquícola e no consumo *per capita* (FAO, 2006). Como conseqüência, a piscicultura vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteína para o consumo humano, sendo a atividade que mais tem crescido em todo o mundo, crescimento este da ordem de 10% ao ano (QUEIROZ et al., 2005). Junto com o crescimento, há um processo de intensificação dos sistemas e necessidade de aumento da produtividade, o qual demanda a utilização de dietas artificiais balanceadas (rações peletizadas ou extrudadas) e que atendam as exigências nutricionais da espécie de peixe produzida, já que o alimento natural é escasso ou inexistente. Sistemas intensivos são caracterizados por elevada biomassa por área, sendo que, a ocorrência de desbalanço ou deficiências nutricionais ocasionadas por dietas mal formuladas podem acarretar em perdas de produtividade, surtos de doença e menor retorno econômico (MEDRI; MEDRI; FILHO, 2005).

Dentre os nutrientes, as vitaminas atuam como catalisadores e reguladores metabólicos. São compostos orgânicos necessários em pouca quantidade e provenientes de fontes exógenas (dieta principalmente), porém com papel vital no metabolismo, sendo envolvidas em diversas reações e vias bioquímicas imprescindíveis para o crescimento, reprodução e manutenção da higidez dos peixes, podendo ser divididas de acordo com sua solubilidade (hidro ou lipossolúveis) (HALVER, 2002; NRC, 1993; PEZZATO et al., 2004). Dentre as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), a vitamina E é uma das mais estudadas na nutrição de peixes.

A vitamina E é um nutriente lipossolúvel com atividade antioxidante protegendo macromoléculas presentes nas células (DNA, proteínas e ácidos graxos) dos processos oxidativos de radicais livres provenientes do metabolismo celular normal ou mecanismos de defesa humoral e celular, além de apresentar propriedades imunoestimulatórias, como aumento da produção de leucócitos e atividade fagocítica (CHEN et al., 2004; PULSFORD et al., 1995; WISE et al., 1993).

A exigência nutricional da vitamina E, assim como o efeito da suplementação ou deficiência, vem sendo determinada para diversas espécies de peixes economicamente importantes como dourada *Sparus aurata* (MONTERO et al., 1999), garoupa *Epinephelus malabaricus* (LIN; SHIAU, 2005), “golden shiner” *Notemigonus crysoleucas* (CHEN et al.,

2004), truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (KIRON et al., 2004; PEARCE; HARRIS; DAVIES, 2003; TRENZATO; HIGUERA; MORALES, 2007), salmão do Atlântico *Salmo salar* (HAMRE et al., 1997, 2004) e bagre do canal *Ictalurus punctatus* (WISE et al., 1993).

Através da hematologia e análise do sangue por aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, pode-se obter informações sobre a condição geral do animal e os possíveis efeitos da vitamina E sobre a eritropoiese e leucopoiese. A presença, quantidade e proporção das diferentes células do sangue refletem o estado fisiológico ou patológico do indivíduo durante determinado período ou ciclo de vida (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

Por possuir hábito alimentar onívoro, rusticidade, altas taxas de crescimento e boa qualidade de carne, o pacu *Piaractus mesopotamicus* é uma das espécies de caracádeo de maior produção e interesse econômico no Brasil (JOMORI et al., 2003, 2005). Entretanto, pouco são os trabalhos a respeito dos efeitos de níveis dietéticos de vitamina E para o pacu (BELO et al., 2005a, 2005b; GARCIA et al., 2007). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de níveis crescentes de vitamina E na dieta de juvenis de pacu sobre os índices de desempenho e variáveis hematológicas.

### **3.1 Desenvolvimento**

#### **3.1.1 Material e Métodos**

##### *Arranjo experimental*

Juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* provenientes de piscicultura comercial, foram anestesiados em solução de benzocaína (1:10.000), pesados em balança eletrônica com precisão de 0,01g ( $7,83 \pm 0,04$  g) separados em lotes homogêneos de 20 peixes e distribuídos em 24 gaiolas experimentais de policloreto de vinila atóxico de 60 L com malha de 5mm de abertura, em sistema fechado de recirculação de água com filtragem biológica e aeração forçada a partir de compressor radial e difusores de ar, compondo um ensaio em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos: 0,0 (I); 25 (II); 50 (III); 150 (IV); 300 (V) e 600mg (VI) de vitamina E por kg de ração na dieta (n=4). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com as

dietas experimentais (08h00m e 17h00m) até aparente saciedade. As condições de temperatura, pH e oxigênio dissolvido na água foram monitoradas diariamente.

Foram elaboradas dietas semi-purificadas de acordo com as recomendações de Halver (2002) e NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC (1993), diferindo apenas nas concentrações de vitamina E correspondentes a cada tratamento (Tabela 5). As dietas experimentais foram armazenadas em recipientes plásticos, mantidas sob refrigeração e protegidas da luz.

Tabela 5 - Composição basal das dietas experimentais

Ingrediente	%
Amido	34,24
Albumina	30,86
Celulose	13,00
Gelatina	7,00
Dextrina	5,00
Fosfato bicálcico	4,00
Óleo soja	3,87
Premix <sup>1</sup> vitamínico e mineral s/ vit E	2,00
BHT	0,02
Composição calculada	%
Proteína bruta	30,1
Matéria seca	92,66
Extrato etéreo	3,2
Matéria mineral	5,66

<sup>1</sup> Suplemento mineral e vitamínico (Supre Mais<sup>®</sup>) ingrediente kg<sup>-1</sup>: vitaminas A (1.200.000 UI); B1 (4.800 mg); B12 (4.800 µg); B2 (4.800 mg); B6 (4.800 mg); C (48 g); D3 (200.000 UI); K3 (2.400 mg); Ácido fólico (1.200 mg); Biotina (48 mg); Pantotenato de cálcio (12.000 mg); Cloreto de colina (108 g); Niacina (24.000 mg); Selênio (100 mg); Iodo (100 mg); Cobalto (10 mg); Cobre (3.000 mg); Ferro (3.000 mg); Manganês (20.000 mg); Zinco (30.000 mg); Veículo Q.S.P (1.000 g); Antioxidante (25 g).

A concentração de vitamina E em cada dieta experimental foi determinada analiticamente e está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Níveis esperados e detectados de vitamina E nas dietas experimentais

Tratamentos	vit E* esperado	vit E* detectado
	mg/kg	mg/kg
I	0,0	Não detectado**
II	25	32,79
III	50	50,33
IV	150	136,40
V	300	246,17
VI	600	457,46

\* Fonte de vitamina E: DL- $\alpha$ -tocoferil acetato (50% de atividade de vit. E) – ROVIMIX E 50 ADS®

\*\* Abaixo do limite de quantificação: 2,0mg/kg

#### *Avaliação dos parâmetros de desempenho*

Aos 21, 42 e 63 dias de experimento, os peixes foram submetidos a 24 horas de jejum, anestesiados (solução de benzocaína 1:10.000), pesados e medidos. Foram calculados e registrados os seguintes parâmetros de desempenho (TACON, 1990):

- ganho de peso médio (GP)

$$GP = PF - PI$$

- índice de conversão alimentar aparente (ICA)

$$ICA = \frac{R_c}{GP}$$

onde  $R_c$  = total de alimento consumido;

- consumo diário de ração (CRD)



- taxa de crescimento específico (TCE)

$$\text{TCE} = 100 \times \frac{(\ln PF - \ln PI)}{t}$$

onde:  $PF$  = peso final (g);  $PI$  = peso inicial (g);  $t$  = período experimental (dias)

#### *Avaliação dos parâmetros hematológicos*

O perfil hematológico dos animais foi feito através de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 3 mL previamente umedecidas com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (10%) em solução salina (0,6%). Foram avaliados os índices hematimétricos absolutos e suas variáveis, contagem diferencial de leucócitos, contagem total de leucócitos e trombócitos, concentração de glicose e proteína total plasmática.

#### *Estimativa da concentração de hemoglobina*

Em função da consistência dos resultados, estabilidade dos reagentes e disponibilidade comercial dos padrões, foi utilizado o método da cianometá-hemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973): 0,02mL (20 $\mu$ L) de sangue foram diluídos em 5mL do reagente de cor da hemoglobina; após 10 minutos (completa conversão da hemoglobina em cianometá-hemoglobina) a amostra foi centrifugada a 10.000g por 15 minutos para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, o sobrenadante recolhido para leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda 540 nm e os resultados expressos em g/100mL.

#### *Valor do hematócrito*

Amostras sanguíneas homogêneas foram introduzidas em capilares para microhematócrito e uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000g em centrífuga de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) e a avaliação feita com auxílio da tabela de microhematócrito e expressa como  $\text{Vol}_{\text{eritrócitos}} / 100\text{cm}^3$ .

### *Contagem total de eritrócitos*

Para a contagem de eritrócitos, alíquotas de sangue foram diluídas em um tubo de ensaio na proporção 0,02 mL de sangue para 4,0 mL do diluente de Natt e Herrick (1952). Após homogeneização da solução a contagem foi feita em câmara de Neubauer. Foram contados os eritrócitos contidos nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara e o resultado expresso em  $\text{Num}_{\text{eritrócitos/leucócitos}} / \text{mm}^3$ .

### *Contagem total de leucócitos e trombócitos*

Extensões sangüíneas de cada animal feitas em lâminas de vidro com extremidade fosca foram secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. A contagem total de leucócitos e trombócitos foi realizada pelo método indireto (MARTINS et al., 2004) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Leucócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ leucócitos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sangüínea}}$$

$$\text{Trombócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ trombócitos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sangüínea}}$$

$$\text{Eritroblastos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ eritroblastos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sangüínea}}$$

### *Contagem diferencial de leucócitos*

Para contagem diferencial das células de defesa (leucócitos) foram realizadas três extensões sangüíneas de cada animal em lâminas com extremidade fosca. As lâminas foram então secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. Foram contadas 100 células em cada lâmina, e o resultado expresso em % de cada tipo celular (linfócito, neutrófilo, monócito, eosinófilo e célula granulocítica especial); em seguida foi calculado o número absoluto de cada um com relação ao número total de leucócitos observados na câmara de Neubauer (MARTINS et al., 2004).

### *Proteína total plasmática*

Alíquotas de plasma foram separadas por centrifugação das amostras de sangue coletadas. A concentração total de proteína plasmática foi determinada através de um refratômetro portátil (WZ-301/Protein 0,0-12,0 g/dL).

### *Glicose plasmática*

Alíquotas das amostras de sangue coletadas foram separadas em microtubos contendo fluoreto; o plasma foi separado por centrifugação e as amostras congeladas para posterior análise. A concentração de glicose plasmática foi determinada através do método enzimático utilizando kit laboratorial GLICOSE GOD-PAP Liquid Stable Mono – Reagente (LABORLAB<sup>®</sup>). Após descongelamento das amostras, 10 µL de plasma foram adicionados a 1000 µL do reagente enzimático, incubados a 37 °C por 10 min. e a absorbância da amostra lida em espectrofotômetro no comprimento de onda 505 nm; o resultado foi expresso em mg/dL.

*Volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)*

As variáveis hematimétricas VCM, HCM e CHCM foram determinadas de acordo com Wintrobe (1934) através dos seguintes cálculos:

$$\text{VCM (fL)} = \frac{\text{Htc} \times 10}{\text{Eri}}$$

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{Eri}}$$

$$\text{CHCM (g dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{Htc}}$$

onde: Htc=hematócrito, Eri=número total de eritrócitos e Hb=concentração de hemoglobina.

#### *Procedimentos estatísticos*

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação de médias de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) (STEEL; TORRIE, 1988) pelo PROC GLM SAS, (SAS Institute, 1985). Para análise da variância, algumas variáveis foram submetidas a transformações para que os valores adquirissem uma distribuição normal e homogeneidade da variância de acordo com a ferramenta SASLAB do aplicativo SAS (1985), como segue:

- nº total de eritrócitos:  $\log_{10}(\text{eri})$
- concentração de glicose sérica:  $\log_{10}(\text{glic})$
- nº de célula granulocítica especial:  $\sqrt{cge + 1,0}$
- nº de eosinófilos:  $\sqrt{eos + 1,0}$
- nº de eritroblastos:  $\log_{10}(\text{eritr})$
- nº total de leucócitos:  $\log_{10}(\text{leuc})$
- nº de linfócitos:  $\log_{10}(\text{linf})$
- nº de monócitos:  $\log_{10}(\text{mon})$
- nº de neutrófilos:  $\log_{10}(\text{neu})$

### 3.1.2 Resultados

#### *Parâmetros de qualidade de água*

Os parâmetros de qualidade de água (Tabela 7) mensurados durante o todo experimento se encontravam dentro dos valores ideais para sobrevivência da espécie segundo Urbinati e Gonçalves (2005).

Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante período experimental

Parâmetro	O <sub>2</sub> D	pH	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Condutividade	Temperatura
	mg/L		mg/L	- mV	°C
Média	5,80	7,30	<0,5	50,02	30,3
Desvio Padrão	0,30	0,20	-	6,3	1,8

#### *Parâmetros de desempenho*

Os parâmetros de desempenho são mostrados na Tabela 8, assim como o percentual de sobrevivência em cada tratamento. Juvenis de pacu alimentados com a dieta contendo vitamina E na concentração de 136,4 mg/kg de ração apresentaram melhor ganho de peso ( $p < 0,05$ ) quando comparados com a dieta ausente de vitamina E. Da mesma forma, a taxa de crescimento específico dos animais alimentados com as dietas contendo vitamina E foi significativamente superior à dieta sem vitamina E. Os demais parâmetros de desempenho como o índice de conversão alimentar e consumo de ração não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos.

Tabela 8 - Ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), índice de conversão alimentar (ICA) e taxa de crescimento específico de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com diferentes níveis de vit. E na dieta

Vit. E*	Parâmetros de desempenho				
	GP	CR	ICA	TCE	Sobrevivência
mg/kg	g/peixe	g/peixe		% / dia	%
0,0	64,17 ± 6,0 <sup>a</sup>	75,02 ± 7,0	1,17 ± 0,08	3,25 ± 0,12 <sup>a</sup>	93,3 ± 6,6
32,79	73,96 ± 6,7 <sup>ab</sup>	83,55 ± 4,6	1,13 ± 0,07	3,44 ± 0,11 <sup>ab</sup>	90,0 ± 3,8
50,33	73,63 ± 8,0 <sup>ab</sup>	82,84 ± 7,5	1,08 ± 0,05	3,49 ± 0,13 <sup>ab</sup>	91,6 ± 6,3
136,4	86,50 ± 12,5 <sup>b</sup>	95,34 ± 14,1	1,10 ± 0,10	3,65 ± 0,18 <sup>b</sup>	84,4 ± 16,7
246,17	85,36 ± 12,2 <sup>ab</sup>	91,47 ± 11,9	1,07 ± 0,08	3,63 ± 0,19 <sup>b</sup>	91,1 ± 3,8
457,46	84,77 ± 0,9 <sup>ab</sup>	91,84 ± 2,2	1,08 ± 0,03	3,63 ± 0,00 <sup>b</sup>	88,8 ± 13,8

Valores na mesma coluna com diferentes letras superscritas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

\* Fonte de vitamina E: DL- $\alpha$ -tocoferil acetato (50% de atividade de vit. E) – ROVIMIX E 50 ADS<sup>®</sup>

A análise de regressão segmentada para o ganho de peso em relação aos diferentes níveis de suplementação de vitamina E na dieta determinou que o melhor ganho de peso foi conseguido com a suplementação de 82,7 mg/kg (Figura 10). O mesmo comportamento ocorreu também para taxa de crescimento específico, o qual apresentou o melhor índice com 76,97 mg/kg de suplementação de vitamina E, valor próximo ao encontrado para o ganho de peso (Figura 10).

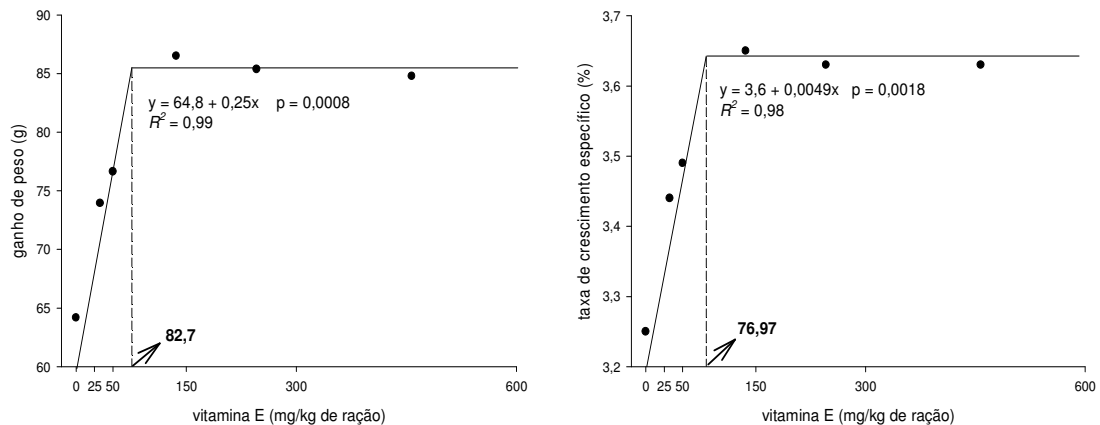


Figura 10 - Modelo da regressão segmentada para o ganho de peso e taxa de crescimento específico de juvenis de *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de vitamina E na dieta

### *Parâmetros hematológicos*

Os resultados referentes à análise da série vermelha e bioquímica dos peixes suplementados com níveis crescentes de vitamina E estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Número total de eritrócitos (Eri), hematócrito (Htc), concentração de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número total de eritroblastos (Eritrob), proteína total plasmática e concentração de glicose plasmática (Glic) de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com diferentes níveis de vit. E na dieta

Variável	Níveis de vit. E* (mg/kg de ração)					
	0,0	32,79	50,33	136,4	246,17	457,46
Eri x 10 <sup>6</sup> /μL	1,46 ± 0,2	1,43 ± 0,3	1,36 ± 0,2	1,35 ± 0,2	1,31 ± 0,2	1,31 ± 0,2
Htc %	32,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	31,5 ± 1,7 <sup>ab</sup>	32,3 ± 1,9 <sup>a</sup>	31,5 ± 1,8 <sup>ab</sup>	31,4 ± 1,7 <sup>ab</sup>	30,1 ± 1,2 <sup>b</sup>
Hb g/dL	10,4 ± 0,7	10,2 ± 0,6	10,3 ± 0,7	10,2 ± 0,9	9,7 ± 0,7	10,0 ± 0,8
VCM fL	229,5 ± 42,5	226,3 ± 41,0	239,6 ± 27,0	239,5 ± 32,3	245,5 ± 43,7	237,7 ± 41,5
HCM pg/cel	72,7 ± 12,0	73,8 ± 14,5	76,3 ± 9,8	76,9 ± 8,9	77,8 ± 14,4	78,5 ± 11,8
CHCM g/dL	31,8 ± 1,5	32,6 ± 2,3	31,8 ± 1,9	32,2 ± 1,6	31,8 ± 3,1	33,2 ± 2,0
Eritrob/μL	13895 ± 4483 <sup>a</sup>	7714 ± 2331 <sup>b</sup>	7158 ± 3049 <sup>b</sup>	6483 ± 2658 <sup>b</sup>	7307 ± 1801 <sup>b</sup>	7057 ± 3415 <sup>b</sup>
Prt g/dL	5,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,3 <sup>bc</sup>	5,3 ± 0,3 <sup>ab</sup>	5,0 ± 0,4 <sup>bc</sup>	4,9 ± 0,4 <sup>bc</sup>	4,6 ± 0,4 <sup>c</sup>
Glic mg/dL	71,9 ± 11,5	76,8 ± 8,8	79,6 ± 14,6	67,8 ± 10,1	84,0 ± 22,8	84,9 ± 21,1

Valores na mesma linha com diferentes letras superscritas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

\* Fonte de vitamina E: DL- $\alpha$ -tocoferil acetato (50% de atividade de vit. E) – ROVIMIX E 50 ADS<sup>®</sup>

Algumas variáveis bioquímicas e hematológicas apresentaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da inclusão de níveis crescentes de vitamina E na dieta. O valor do hematócrito apresentou os maiores valores, 32,6 e 32,3% nas dietas contendo 0,0 e 50,33 mg/kg de ração, respectivamente. Por outro lado, o menor valor (30,1%) foi observado no maior nível de inclusão de vitamina E na dieta (457,46 mg/kg). Seguindo o mesmo comportamento, a concentração de proteína total plasmática apresentou o maior valor (5,5 g/dL;  $p < 0,05$ ) no tratamento correspondente à dieta sem suplementação de vitamina E, e o menor valor (4,6 g/dL;  $p < 0,05$ ) nos peixes alimentados com a dieta contendo o maior nível suplementação. O número total de eritroblastos foi significativamente maior nos peixes alimentados com a dieta sem suplementação



de vitamina E em relação aos demais tratamentos, os quais havia vitamina E em sua formulação (Figura 11).

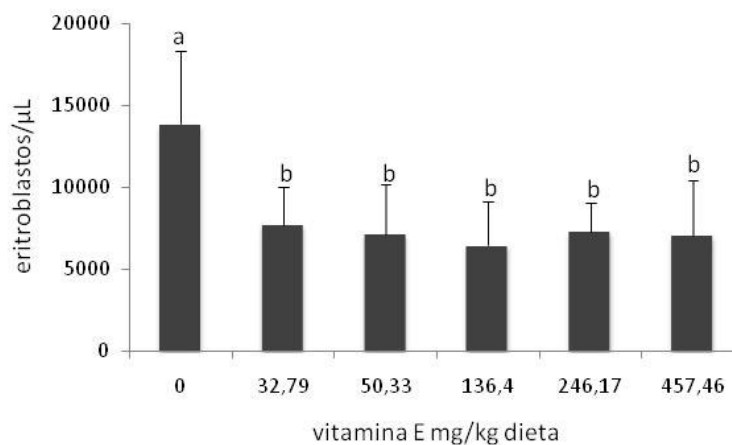


Figura 11 - Número de eritroblastos de juvenis de *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de vitamina E na dieta. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

Os valores referentes ao número total de leucócitos, trombócitos e contagem diferencial de leucócitos nos diferentes tratamentos estão representados na Tabela 10. Não foram observadas diferenças significativas dos parâmetros leucométricos e trombométricos entre os tratamentos.

Tabela 10 - Número total de trombócitos (Tromb) e leucócitos (Leuc) e contagem diferencial de leucócitos (linfócitos (Linf), monócitos (Mon), neutrófilos (Neu), eosinófilos (Eos) e célula granulocítica especial (CGE)) de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com diferentes níveis de vit. E na dieta

Variável	Níveis de vit. E* (mg/kg de ração)					
	0,0	32,79	50,33	136,4	246,17	457,46
Tromb/ $\mu$ L	29642 $\pm$ 7612	24696 $\pm$ 6856	24494 $\pm$ 4249	26144 $\pm$ 4935	22165 $\pm$ 5474	24747 $\pm$ 6646
Leuc/ $\mu$ L	6208 $\pm$ 2529	6111 $\pm$ 3078	5283 $\pm$ 1919	7620 $\pm$ 2399	6774 $\pm$ 2301	5355 $\pm$ 2008
Linf/ $\mu$ L	4373 $\pm$ 1876	4156 $\pm$ 2429	3502 $\pm$ 1603	5597 $\pm$ 1722	5091 $\pm$ 2146	3786 $\pm$ 1652
Mon/ $\mu$ L	244 $\pm$ 121	424 $\pm$ 249	390 $\pm$ 215	412 $\pm$ 222	340 $\pm$ 211	362 $\pm$ 163
Neu/ $\mu$ L	924 $\pm$ 309	922 $\pm$ 416	1013 $\pm$ 412	922 $\pm$ 405	1011 $\pm$ 518	952 $\pm$ 378
Eos/ $\mu$ L	194 $\pm$ 176	147 $\pm$ 144	259 $\pm$ 178	233 $\pm$ 140	191 $\pm$ 100	141 $\pm$ 117
CGE/ $\mu$ L	71 $\pm$ 68	80 $\pm$ 76	59 $\pm$ 76	82 $\pm$ 54	57 $\pm$ 56	113 $\pm$ 82

\* Fonte de vitamina E: DL- $\alpha$ -tocoferil acetato (50% de atividade de vit. E) – ROVIMIX E 50 ADS<sup>®</sup>

### 3.1.3 Discussão

Em muitas espécies animais, a dieta pode influenciar o desempenho e a capacidade do animal de resistir a doenças infecciosas (ALCORN et al., 2003; BLAZER, 1991; LALL, 2000; LANDOLT, 1989; SITJA-BOBADILLA; PÉREZ-SANCHEZ, 1999). No presente estudo, peixes que receberam a dieta deficiente em vitamina E apresentaram menor crescimento e ganho de peso em relação àqueles alimentados com as dietas suplementadas com vitamina E. O maior ganho de peso observado correspondeu a dieta suplementada com 136,4 mg/kg de vitamina E, e quando utilizado a análise de regressão segmentada, esse valor diminuiu para 82,7 mg/kg. Valor semelhante também foi determinado para tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, em torno de 50-100 mg/kg (SATO; TAKEUCHI; WATANABE, 1987), porém diferentes valores podem ser encontrados na literatura dependendo da espécie de peixe estudada, visto que algumas possuem menor exigência: 35 mg/kg para salmão do Atlântico (LALL et al., 1988), 25 mg/kg para tilápia

azul *Oreochromis aureus* (ROEM; KOHLER; STICKNEY, 1990), bagre do canal (MURAI; ANDREWS, 1974), truta arco-íris (HUNG; CHO; SLINGER, 1980) e robalo híbrido *Morone chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂ (KOCABAS; GATLIN, 1999). Algumas espécies possuem maior exigência: 100 mg/kg para carpa comum *Cyprinus carpio* (WATANABE et al., 1970); 104 a 115 mg/kg para a garoupa *Epinephelus malabaricus* dependendo da quantidade de lipídeos na dieta (LIN; SHIAU, 2005) e 131 mg/kg para o rohu *Labeo rohita* (SAU et al., 2004).

Diferenças significativas no desempenho de peixes alimentados com diferentes níveis de vitamina E na dieta também foram descritas em salmão do Atlântico *Salmo salar* (HAMRE et al., 1997), truta arco-íris *Onchorynchus mykiss* (PEARCE; HARRIS; DAVIES, 2003, TRENZATO; HIGUERA; MORALES, 2007), salmão Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* (THORARINSSON et al., 1994) garoupa *Epinephelus malabaricus* (LIN; SHIAU, 2005) e rohu *Labeo rohita* (SAU et al., 2004), sendo os menores índices encontrados nos tratamentos deficientes em vitamina E, o que demonstra a sua essencialidade como nutriente na dieta para peixes. Porém, não são todas as espécies de peixes que respondem dessa forma, como observado para “golden shiner” *Notemigonus crysoleucas* (CHEN et al., 2004), bagre do canal *Ictalurus punctatus* (GAYLORD; RAWLES; GATLIN, 1998; WISE et al., 1993), dourada *Sparus aurata* (MONTERO et al., 1999), truta arco-íris (CLERTON et al., 2001), salmão do Atlântico (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990, POSTON; COMBS; LEIBOVITZ, 1976), pacu *Piaractus mesopotamicus* (BELO et al., 2005b), truta arco-íris (KIRON et al., 2004) e robalo híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis* (TRUSHENSKI; KOHLER, 2008).

Não foi registrado qualquer sinal clínico de deficiência, com exceção do menor ganho de peso observado nos peixes alimentados com a dieta deficiente em vitamina E; Clerton et al. (2001) também não observaram sinais de deficiência em truta arco-íris alimentados com dieta deficiente em vitamina E por um período de 80 dias. Por ser uma vitamina de caráter lipossolúvel e armazenável no organismo, o tempo de experimentação, assim como a alimentação dos peixes durante 15 dias com a dieta sem suplementação de vitamina E com o intuito de exaurir as reservas podem não ter sido suficientes para os animais apresentarem sinais de deficiência. Diversos trabalhos descrevem o aparecimento dos sinais clínicos referentes à deficiência da vitamina em peixes, desde escurecimento do tegumento (CHEN et al., 2004) a falta de pigmentação (HAMRE et al., 1997), distrofia e necrose da musculatura axial (CHEN et al., 2004) e distúrbios hematológicos caracterizados por quadros anêmicos (CHEN et al., 2004; HAMRE et

al., 1997; PEARCE; HARRIS; DAVIES, 2003; POSTON; COMBS; LEIBOVITZ, 1976; WISE et al., 1993).

Os diferentes níveis de suplementação de vitamina E não influenciaram o número total e a proporção das células de defesa orgânica (Tabela 10). Resultados semelhantes também foram observados em pacus (GARCIA et al., 2007) e salmão do Atlântico (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990) suplementados com diferentes níveis de vitamina E. Porém, tanto o aumento como a queda do número das células de defesa pode ocorrer em peixes alimentados com dietas deficientes em vitamina E, como descritos por Chen et al. (2004) e Lin e Shiau (2005), respectivamente. Apesar de Chen et al. (2004) constatarem aumento do número de leucócitos e trombócitos, na contagem diferencial de leucócitos foi observado queda no número de linfócitos, ao contrário das demais células de defesa e que, segundo os autores, pode ter ocorrido devido a maior fragilidade de membrana dos linfócitos e conseqüente lise e/ou migração dos mesmos para o tecido muscular, o qual se encontrava com sinais de necrose e degeneração, características de um quadro de deficiência vitamínica.

Não foram avaliados parâmetros imunológicos ou feito desafio aos peixes por algum agente infeccioso no intuito de verificar se os diferentes níveis de suplementação de vitamina E na dieta de juvenis de pacu inferiram melhoras ao sistema imune e resistência a doenças. Mesmo assim, inúmeros trabalhos científicos mostram uma forte relação entre a suplementação de vitamina E na dieta de peixes com propriedades imunoestimulatórias (BELO et al., 2005b, CHEN et al., 2004, HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990, KIRON et al., 2004, LIN; SHIAU, 2005, MONTERO et al., 1999, PEARCE; HARRIS; DAVIES, 2003, WISE et al., 1993), resistência a patógenos (WISE et al., 1993, THORARINSSON et al., 1994) e situações estressantes (CHEN et al., 2004, MONTERO et al., 1999).

Baixos níveis de vitamina E na dieta podem ocasionar maior fragilidade de membrana dos eritrócitos de peixes e deformidades na membrana celular, tornando-os mais susceptíveis à hemólise (HALVER, 2002), o que reduz sua meia vida na circulação periférica e conseqüente queda nos valores do hematócrito e concentração de hemoglobina, caracterizando um estado anêmico (CHEN et al., 2004, PEARCE; HARRIS; DAVIES, 2003, POSTON; COMBS; LEIBOVITZ, 1976, THORARINSSON et al., 1994). Entretanto, não foi observada diferença significativa na concentração de hemoglobina e número de eritrócitos entre os tratamentos (Tabela 9), apesar dos valores encontrados na literatura para a espécie com relação ao número de

eritrócitos serem maiores (MARTINS et al., 1995; RANZANI-PAIVA et al., 1998/1999; TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004; TAVARES-DIAS et al., 1999, 2002). Com relação ao hematócrito, os valores se comportaram de forma inversa, ou seja, o maior e o menor valor ocorreram nos animais alimentados com a dieta deficiente e na com maior nível de suplementação de vitamina E, respectivamente. Em concordância com os resultados, Garcia et al. (2007) também encontraram maiores valores de hematócrito em pacus alimentados com dietas sem suplementação de vitamina E.

O número de eritroblastos foi significativamente maior nos peixes alimentados com dieta deficiente em vitamina E (Figura 11). É comum a presença de células imaturas na circulação periférica de peixes, como leucócitos e eritrócitos jovens (eritroblastos), os quais são comumente observados em extensões sanguíneas sob microscopia óptica de luz (ESTEBAN; MUÑOZ; MESEGUER, 2000), e que terminam a maturação na própria circulação periférica. Em determinados processos patológicos a quantidade de células imaturas pode aumentar, como ocorrido no presente estudo e no trabalho realizado por Garcia et al. (2007) com pacus e Poston, Combs e Leibovitz (1976) em salmões do Atlântico recebendo dietas sem suplementação de vitamina E. Nesses casos, a meia vida dos eritrócitos diminui, gerando maior liberação de células jovens na circulação sanguínea como mecanismo compensatório.

Segundo Esteban et al. (1989) o processo de eritropoiese em peixes é determinado pelo desenvolvimento e maturação das células vermelhas, sendo que a série eritróide consiste nos seguintes tipos celulares: proeritroblasto, eritroblasto basofílico, eritroblasto policromático, eritroblasto acidófilo, eritrócito jovem e eritrócito senil. O processo de maturação dessas células envolve a condensação da cromatina e progressivo aumento na quantidade de hemoglobina e diminuição do tamanho nuclear e celular. Levando em conta que os eritroblastos são células jovens e possuem maior tamanho, conseqüentemente um maior número dessas células na circulação periférica dos peixes alimentados com as dietas não suplementadas justifica os valores encontrados para o hematócrito no presente trabalho e de Garcia et al. (2007) apesar de não ter havido diferenças nos valores do volume corpuscular médio (VCM).

O estado fisiológico de um indivíduo pode ser avaliado por meio de parâmetros hematológico e bioquímicos. A aclimação dos peixes, instalações experimentais, procedimentos de manejo e coleta de material biológico foram adequados, já que não houve diferença na concentração de glicose plasmática. A concentração de proteína total plasmática está

estritamente relacionada com o metabolismo protéico e condição nutricional (COLES, 1984). A maior concentração de proteína total plasmática verificada nos peixes não suplementados com vitamina E é semelhante aos resultados encontrados por Poston, Combs e Leibovitz (1976), sugerindo que esse aumento pode ser devido à liberação de proteína celular proveniente da hemólise dos eritrócitos.

Resultados contraditórios encontrados na literatura demonstram que a quantidade necessária de vitamina E para que haja um bom desenvolvimento e manutenção da sanidade dos peixes sofre ação de inúmeras variáveis. Além da origem (natural ou sintética) e tipo (estrutura química) da vitamina utilizada (TRUSHENSKI; KOHLER, 2008) e ambiente de criação (GAYLORD; RAWLES; GATLIN, 1998), a interação entre os nutrientes da dieta é um dos mais importantes fatores que contribuem com a exigência da vitamina. Dentre as interações, a mais estudada em peixes é com relação à vitamina C (CHEN et al., 2004, GARCIA et al., 2007; HAMRE et al., 1997, MONTERO et al., 1999). O ácido ascórbico sofre oxidação em detrimento da vitamina E, sendo que, a primeira pode ser regenerada posteriormente por meio de reações químicas e enzimáticas com a glutatona (HAMRE et al., 1997). Da mesma forma, o selênio também pode influenciar na exigência da vitamina E em peixes (JARAMILLO; PENG; GATLIN, 2008, POSTON; COMBS; LEIBOVITZ, 1976, THORARINSSON et al., 1994) visto que esse micronutriente atua como co-fator da enzima glutatona peroxidase, o qual catalisa as reações que convertem o peróxido de hidrogênio à água e os ácidos graxos hidroperóxidos a ácidos graxos alcoólicos, conferindo proteção às membranas celulares contra danos da oxidação (NRC, 1993, PEZZATO et al., 2004).

Níveis elevados de lipídeos na dieta também influenciam na exigência de vitamina E (CHAIYAPECHARA et al., 2003; KIRON et al., 2004; LIN; SHIAU, 2005). A concentração de vit E no fígado e tecido muscular de garoupas foi menor nas dietas com maior nível de lipídeos (9%) em relação à dieta com menor nível (4%), sugerindo que a menor concentração da vitamina nos tecidos nas dietas com maior concentração de lipídeos foi devido à utilização da mesma para proteção dos ácidos graxos insaturados da oxidação (LIN; SHIAU, 2005).

O fato dos peixes não terem apresentado nenhum sinal clínico severo de deficiência vitamínica, como atrofia da musculatura axial, anemias e pigmentação alterada (CHEN et al., 2004; HALVER, 2002; POSTON; COMBS; LEIBOVITZ, 1976) pode ser devido ao tempo de experimentação não ter sido suficiente para tal e, em particular para espécie, como ocorrido no

trabalho realizado por Belo et al. (2005b) e Garcia et al. (2007) com o pacu. Não podemos descartar também a natureza lipossolúvel do nutriente, o que confere a capacidade de ser armazenado (HALVER, 2002). Sendo assim, o tempo de administração da dieta isenta de vitamina E para os peixes antes do início do experimento com o intuito de exaurir as reservas hepáticas por 15 dias não foram suficientes, fato semelhante ocorrido com salmão do Atlântico (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990).

Estudos no que diz respeito à exigência nutricional da vitamina E e efeitos da suplementação para espécie são necessários em vista da escassez ou até inexistência de trabalhos para espécie em questão, o qual possui grande importância econômica.

### 3.2 Conclusão

A vitamina E é um nutriente essencial para o pleno desenvolvimento de juvenis de pacu e que sua deficiência impõe um maior estresse metabólico no processo de eritropoiese como mecanismo compensatório do maior *turnover* das células vermelhas. Esse efeito compensatório por sua vez, pode gerar uma maior demanda energética e protéica para formação dessas novas células sanguíneas, prejudicando o desempenho do animal.

### Referências

- ALCORN, S.W.; PASCHO, R.J.; MURRAY, A.L.; SHEARER, K.D. Effects of ration level on immune function in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Oxford, v. 217, p. 529-545, 2003.
- BELO, M.A.A.; FENERICK Jr., J.; SOARES, V.E.; MORAES, F.R. Suplementação com DL- $\alpha$  acetate de tocoferila e parasitismo por *Anacanthorus penilabiatus* (Monogea: Dactylogyridae) em *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 73-79, Jan./Mar. 2005a.
- BELO, M.A.A.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; SOARES, V.E.; OTOBONI, A.M.M.B.; MORAES, J.E.R. Effect of dietary supplementation with vitamin e and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 133, p. 146-154, 2005b.
- BLAXHALL, P.C.; DAISLEY, K.W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, p. 771-781, 1973.

BLAZER, V.S. Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 77-86, 1991.

CHAIYAPECHARA, S.; CASTEN, M.T.; HARDY, R.W.; DONG, F.M. Fish performance, fillet characteristics, and health assessment index of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing adequate and high concentrations of lipid and vitamin E. **Aquaculture**, Oxford, v. 219, p. 715-738, 2003.

CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.J. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**, Oxford, v. 242, p. 553-569, 2004.

CLERTON, P.; TROUTAUD, D.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; DESCHAUX, P. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytic functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 11, p. 1-13, 2001.

COLES, E.H. Função hepática. In: COLES, E.H. (Ed.). **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. cap 7, p. 185-219.

ESTEBAN, M.A.; MUÑOZ, J.; MESEGUER, J. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). flow cytometric and microscopic studies. **The Anatomical Record**, New York, v. 258, p. 80-89, 2000.

ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J.; AYALA, A.G.; AGULLEIRO, B. Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. **Archives of Histology and Cytology**, Niigata, v. 52, n. 4, p. 407-419, 1989.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO Fisheries Department, 2006. 162 p.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, Oxford, v. 271, p. 39-46, 2007.

GAYLORD, T.G.; RAWLES, S.D.; GATLIN III, D.M. Re-evaluation of vitamin E supplementation of practical diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*, production. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 4, p. 109-114, 1998.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 56, p. 35-39, 1971.

HALVER, J.E. The vitamins. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish nutrition**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2002. chap. 2, p. 62-141.



HAMRE, K.; WAGBOO, R.; BERGE, R.K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 22, n. 1/2, p. 137-149, 1997.

HAMRE, K.; CHRISTIANSEN, R.; WAAGBO, R.; MAAGE, A.; TORSTENSEN, B.E.; LYGREN, B.; LIE, O.; WATHNE, E.; ALBREKTSEN, S. Antioxidant vitamins, minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): effects on growth performance and fillet quality. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 10, p. 113-123, 2004.

HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Oxford, v. 87, p. 1-13, 1990.

HUNG, S.S.O.; CHO, C.Y.; SLINGER, S.J. Measurement of oxidation in fish oil and its effect on vitamin E nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 37, p. 1248-1253, 1980.

JARAMILLO Jr., F.; PENG, L.; GATLIN III, D.M. Selenium nutrition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) bioavailability, toxicity and interaction with vitamin E. **Aquaculture Nutrition**, Oxford. 2008. In press.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, Oxford, v. 222, p. 277-287, 2003.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MARTINS, M.I.E.G.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, Oxford, v. 243, p. 175-183, 2005.

KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; ISHIZAKA, K.; SATOH, S.; WATANABE, T. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. **Aquaculture**, Oxford, v. 234, p. 361-379, 2004.

KOCABAS, A.M.; GATLIN III, D.M. Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops female* x *M. saxatilis male*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 5, p. 3-7, 1999.

LALL, S.P. Nutrition and health of fish. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Avances em nutrição acuícola: memórias...** Mérida, 2000. p. 13-23.

LALL, S.P.; OLIVIER, G.O.; HINES, J.A.; FERGUSON, H.F. The role of vitamin E in nutrition and immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquacultures. Canadian. Bulletin**, Saint Jhon's, v. 88, p. 76-78, 1988.

LANDOLT, M.L. The relationship between diet and the immune response of fish. **Aquaculture**, Oxford, v. 79, p. 193-206, 1989.

LIN, Y.H.; SHIAU, S.Y. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. **Aquaculture**, Oxford, v. 248, p. 235-244, 2005.

MARTINS, M.L.; CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F.; URBINATI, E.C. Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre parâmetros hematológicos de alevinos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Revista Brasileira de Zootecnia**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 609-618, 1995.

MARTINS, M.L.; PILARSKI, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr, J. ; RIBEIRO, K.; MIYAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.

MEDRI, V.; MEDRI, W.; FILHO, M.C. Desempenho de tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus* L.) alimentados com diferentes níveis de proteínas de levedura de destilaria em tanques-rede. **Acta Scientiarum. Animal Science**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 221-227, April/June, 2005.

MONTERO, D.; MARRERO, M.; IZQUIERDO, M.S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J.M.; TORT, L. Effects of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, Oxford, v. 171, p. 269-278, 1999.

MURAI, T.; ANDREWS, J. W. Interactions of dietary  $\alpha$ -tocopherol, oxidized menhaden oil and ethoxyquin on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 104, p. 1416-1431, 1974.

NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, Champaign, v. 31, p. 735-738, 1952.

NAYLOR, R.; BURKE, M. Aquaculture and ocean resources: raising tigers of the sea. **Annual Review Environmental Resource**, v. 30, p. 185-218, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of fish**. Washington: National Academic Press, 1993. 105 p.

PEARCE, J.; HARRIS, J.E.; DAVIES, S.J. The effect of vitamin E on the serum complement activity of rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 9, p. 337-340, 2003.

PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 5, p. 75-169.

POSTON, H.A.; COMBS Jr, G.F.; LEIBOVITZ, L. Vitamin E and selenium interrelation in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 106, p. 892-904, 1976.

PULSFORD, A.L.; CRAMPE, M.; LANGSTON, A.; GLYNN, P.J. Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 5, p. 631-643, 1995.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO-FILHO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture**, Baton Rouge, v. 36, n. 1, p. 45-50, Mar. 2005.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, E A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.S.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. cap. 4, p. 89-120.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, F.A.; EIRAS, J.C.; EIRAS, A.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A.C. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 77-83, 1998/1999.

ROEM, A. J.; KOHLER, C.C.; STICKNEY, R.R. 1990. Vitamin E requirements of the blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner), in relation to dietary lipid levels. **Aquaculture**, Oxford, v. 87, p. 155-164, 1990.

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

SAS INSTITUTE. **Statistical guide for personal computers**. 5<sup>th</sup> ed. Cary, 1985. 956p.

SATO, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Requirement of tilapia for  $\alpha$ -tocopherol. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 53, p. 119-124, 1987.

SAU, S.K.; PAUL, B.N.; MOHANTA, K.N.; MOHANTY, S.N. Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (*Labeo rohita*) fry. **Aquaculture**, Oxford, v. 240, p. 359-368, 2004.

SITJÁ-BOBADILLA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 9, p. 637-640, 1999.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 569 p.

TACON, A.G.J. **Standard methods for the nutrition of farmed fish and shrimp**. Seattle: Argent Laboratories Press, 1990. 208 p.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 157-162, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 16, p. 423-431, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; SCHALCH, S.H.C.; ONAKA, E.M.; QUINTANA, C.I.F.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 574-554, 2002.

THORARINSSON, R.; LANDOLT, M.A.; ELLIOTT, D.G.; PASCHO, R.J.; HARDY, R.W. Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Oxford, v. 121, p. 343-358, 1994.

TRENZATO, C.E.; HIGUERA, M.; MORALES, A.E. Influence of dietary vitamins E and C and HUFA on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance under crowding conditions. **Aquaculture**, v. 236, p. 249-258, 2007.

TRUSHENSKI, J.T.; KOHLER, C.C. Influence of vitamin E source and dietary supplementation level on production performance of sunshine bass, *Morone chrysops*♀ x *Morone saxatilis*♂, fillet tocopherol content, and immunocompetency during stress and bacterial challenge. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 34, n. 4, p. 454-466, 2008.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. cap. 10, p. 225-255.

WATANABE, T.; TAKASHIMA, F.; OGINO, C.; HIBIYA, T. Requirements of young carp for  $\alpha$ -tocopherol. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 36, p. 972-976, 1970.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v. 51, p. 32-49, 1934.

WISE, D.J.; TOMASSO, J.R.; SCHWEDLER, T.E.; BLAZER, V.S.; GATLIN III, D.M. Effect of vitamin E on the immune responses of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 5, p. 183-188, 1993.

#### **4 MANANOLIGOSSACARÍDEO NA DIETA DE JUVENIS DE PACU *PIARACTUS MESOPOTAMICUS* (HOLMBERG 1887): ASPECTOS HEMATOLÓGICOS E DE DESEMPENHO.**

##### **Resumo**

Sistemas intensivos de produção expõem os peixes a uma série de agentes estressores, os quais afetam de forma negativa sua sanidade limitando o rendimento econômico da atividade. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição de níveis crescentes de mananoligossacarídeos (MOS, ActiveMOS<sup>®</sup> - Biorigin) na dieta do pacu sobre o desempenho, hematologia e morfologia intestinal. Os peixes (44,04 g) foram aleatoriamente distribuídos em caixas (500L; 10 peixes por caixa) e alimentados por 60 dias com as dietas experimentais (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0% de inclusão), em um delineamento totalmente casualizado (n=3). Não foi observado efeito dos tratamentos sobre o desempenho ( $p>0,05$ ). Houve efeito ( $p<0,05$ ) dos tratamentos sobre o número de eritrócitos, neutrófilos e proteína total plasmática. Houve efeito do tempo ( $p<0,05$ ) sobre as variáveis hematológicas, como aumento na concentração de glicose plasmática e queda no número total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos entre outros, sendo esses, atribuídos ao estresse de manejo. Não houve diferença no perímetro das vilosidades intestinais dos peixes alimentados com a dieta controle, 0,4 e 1,5% de suplementação de MOS, apesar dos peixes suplementados com o prebiótico apresentarem, em valores absolutos, maior perímetro quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle. A adição de MOS na dieta do pacu não apresentou efeito prebiótico ( $p>0,05$ ) e capacidade de minimizar os efeitos do estresse sobre as variáveis hematológicas. Estudos com relação à caracterização da microbiota intestinal do pacu são necessários para determinar o efetivo uso do suplemento como prebiótico para a espécie.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*; Hematologia; Nutrição; Prebiótico

**Dietary mannan oligosaccharides to juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887): growth and hematological aspects.**

##### **Abstract**

Intensification of aquaculture production systems exposes fish to numerous stressors, which may negatively affect their health and limit profitability of aquaculture systems. This study determined effects of increasing levels of dietary mannan oligosaccharides (MOS, ActiveMOS<sup>®</sup> - Biorigin) on performance, hematology and intestine morphology of pacu. Fish (44.04 g) were randomly distributed into 12 tanks (500L; 10 fishes per tank) and fed during 60 days with a commercial diet supplemented with 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 and 2,0% dietary MOS. There were no differences ( $p>0.05$ ) in growth parameters between fish fed control diet and MOS-supplemented diets. RBC, neutrophils number and total plasmatic protein showed treatment effects ( $p<0.05$ ). Hematology presented significant differences during experimental Trial, such as

increased plasmatic glucose concentrations and decreased WBC and differential leukocyte count, attributed to handling stress. There were no effects ( $p>0.05$ ) on intestinal morphology, although fish fed diets containing 0.4 and 1.5% MOS presented, in absolute values, higher intestinal villi perimeter compared to fish fed control diet. MOS supplementation did not present prebiotic effects for pacu and did not minimize stress effects on hematology. Studies regarding intestinal microbiota characterization are necessary to determine the effective use of this supplement as a prebiotic for pacu.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*; Hematology; Nutrition; Prebiotic

#### 4.1 Introdução

A intensificação dos sistemas de produção expõe os peixes a uma série de agentes estressores, como baixa qualidade da água, alta densidade populacional, manejo e transporte, os quais afetam de forma negativa o sistema imune e sanidade. O sistema imune debilitado devido ao estresse causado pelo ambiente de produção torna os animais susceptíveis a doenças e surtos epizoóticos que limitam o desenvolvimento econômico da aquicultura (GATESOUBE 1999; PLUMB 1999; SAKAI 1999; SHEPHERD, 1992).

O uso de aditivos com capacidade imunoestimulantes na nutrição animal (aves e suínos) com o intuito de aumentar a resistência a doenças e reduzir o uso de antibióticos através do estímulo da atividade leucocitária e incremento da saúde intestinal vem sendo feito há algum tempo (NEWMAN; NEWMAN, M., 2001; SPRING et al., 2000). O uso desses aditivos também começou a ser empregado na nutrição de peixes, com ênfase nos mananoligossacarídeos (MOS) provenientes da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (GATESOUBE, 1999; GATLIN et al., 2006; RAA, 2000; SAKAI, 1999). Trabalhos utilizando MOS na dieta de animais aquáticos como lagostas da espécie *Homarus gammarus*, esturjão do México e tilápia do Nilo foram realizados por Daniels et al. (2006), Pryor et al. (2003) e Vendemiatti, Costa e Cyrino (2003) respectivamente. Recentemente, Staykov et al. (2007), Sado, Bicudo e Cyrino (2008) estudaram o efeito da suplementação de MOS na dieta de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) respectivamente, sobre o desempenho e sobrevivência. Entretanto, os resultados encontrados muitas vezes são contraditórios.

O complexo de carboidratos (mananoligossacarídeos) constitui uma fonte rica em manose disponível para adesão bacteriana, adsorvendo os patógenos e impedindo sua ligação à parede intestinal (GOUVEIA et al., 2006; VENDEMIATTI; COSTA; CYRINO, 2003). Quando a

aderência das bactérias aos enterócitos é inibida, não há formação de colônias que possam indisponibilizar nutrientes para o animal ou infeccionar suas células intestinais (FERKET; PARKS; GRIMES, 2002). Com isso, observa-se aumento da integridade das vilosidades intestinais e, conseqüentemente, melhora da saúde intestinal e um melhor aproveitamento dos nutrientes (NEWMAN, 2007; PELICANO et al., 2005).

Devido ao seu hábito alimentar onívoro, altas taxas de crescimento e boa qualidade de carne, o pacu *Piaractus mesopotamicus* é uma das espécies de caracádeo de maior produção e interesse econômico no Brasil (JOMORI et al., 2003). Entretanto, pouco se conhece sobre seu manejo sanitário nos sistemas de produção. O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos da suplementação dietética de mananoligossacarídeos sobre os parâmetros de desempenho e hematologia e morfologia intestinal de juvenis de pacu.

## 4.1 Desenvolvimento

### 4.1.1 Material e Métodos

#### *Arranjo experimental*

Espécimes juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* provenientes de piscicultura comercial, mantidos nas instalações do Laboratório de Nutrição de Peixes do setor de Piscicultura da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, foram anestesiados em solução de benzocaína (1:10.000), pesados em balança eletrônica com precisão de 0,01 g ( $44,04 \pm 5,27$  g), medidos ( $10,62 \pm 0,64$  cm), separados em lotes homogêneos de 10 peixes e distribuídos em 12 caixas circulares de polietileno (1.000 L) divididas ao meio por uma tela plástica, abastecidas por um sistema fechado de recirculação de água com filtragem biológica e aeração forçada a partir de compressor radial e difusores de ar, compondo um ensaio em delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8, 1,0, 1,5 e 2,0% de inclusão de MOS<sup>4</sup> na dieta (n=3). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (08h00m e 17h00m) até aparente saciedade por 60 dias e as condições de temperatura, pH e oxigênio dissolvido na água foram monitoradas diariamente durante todo o período experimental.

---

<sup>4</sup> ActiveMOS® - mananoligossacarídeo Biorigin

Para elaboração das dietas, uma ração comercial (Tabela 11) foi finamente moída e homogeneizada em peneiras de 1 mm. Foram adicionados e misturados à ração os níveis de MOS correspondentes a cada tratamento. A mistura foi umedecida e granulada em moinho de rosca sem fim. Após secagem (18 horas) em estufa de ventilação forçada (45°C), as dietas foram armazenadas em recipientes plásticos e mantidas sob refrigeração durante todo período experimental.

Tabela 11 - Composição química da dieta comercial (controle) com base na matéria seca

Nutriente	%
Proteína bruta	27,43
Energia Bruta	9,69
Fibra bruta	5,48
Matéria seca	94,87
Umidade	5,13
Matéria mineral	14,72

Composição da pré-mistura vitamínica e mineral por kg de ração (Purina do Brasil Ind. Com. Ltda. Brasil): Mg 700.0 mg; Fe 100.0 mg; Cu 15 mg; Zn 200.0 mg; Mn 30 mg; I 1.0 mg; Se 0.3 mg; vitamina A 9,000 IU; vitamina D<sub>3</sub> 3,000 IU; vitamina E 112.0 IU; vitamina K 7.50 IU; Ácido fólico 7.50 mg; Biotina 0.6 mg; Colina 500.0 mg; Niacina 112.0 mg; Pantotenato de cálcio 37.0 mg; Tiamina 22.0 mg; Riboflavina 22.0 mg; Piridoxina 22.0 mg; vitamina B<sub>12</sub> 26.0 µg; vitamina C 150.0 mg

#### *Avaliação dos parâmetros de desempenho*

Aos 21, 42 e 63 dias de experimento, os peixes foram submetidos a 24 horas de jejum, anestesiados (solução de benzocaína 1:10.000), pesados e medidos. Foram calculados e registrados os seguintes parâmetros de desempenho (TACON, 1990):

- ganho de peso médio (GP)
- índice de conversão alimentar aparente (ICA)

$$ICA = \frac{R_c}{GP}$$

onde  $R_c$  = total de alimento consumido;



- consumo diário de ração (CRD)
- taxa de crescimento específico (TCE)

$$TCE = 100 \times \frac{(\ln PF - \ln PI)}{t}$$

onde:  $PF$  = peso final (g);  $PI$  = peso inicial (g);  $t$  = período experimental (dias)

#### *Avaliação dos parâmetros hematológicos*

O perfil hematológico dos animais foi feito através de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 3 mL previamente umedecidas com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (10%) em solução salina (0,6%). Foram avaliados os índices hematimétricos absolutos e suas variáveis: contagem diferencial de leucócitos, contagem total de leucócitos e trombócitos, concentração de glicose e proteína total plasmática.

#### *Estimativa da concentração de hemoglobina*

Em função da consistência dos resultados, estabilidade dos reagentes e disponibilidade comercial dos padrões, foi utilizado o método da cianometá-hemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973): 0,02 mL (20  $\mu$ L) de sangue foram diluídos em 5 mL do reagente de cor da hemoglobina; após 10 minutos (completa conversão da hemoglobina em cianometá-hemoglobina) a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, o sobrenadante recolhido para leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda 540 nm e os resultados expressos em g/100 mL.

#### *Valor do hematócrito*

Amostras sanguíneas homogêneas foram introduzidas em capilares para microhematócrito e uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 g em centrífuga de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) e a avaliação feita com auxílio da tabela de microhematócrito e expressa como  $Vol_{eritrócitos} / 100 \text{ cm}^3$ .

### *Contagem total de eritrócitos*

Para a contagem de eritrócitos, alíquotas de sangue foram diluídas em um tubo de ensaio na proporção 0,02mL de sangue para 4,0 mL do diluente de Natt e Herrick (1952). Após homogeneização da solução a contagem foi feita em câmara de Neubauer. Foram contados os eritrócitos contidos nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara e o resultado expresso em  $\text{Num}_{\text{eritrócitos/leucócitos}} / \text{mm}^3$ .

### *Contagem total de leucócitos e trombócitos*

Extensões sangüíneas de cada animal feitas em lâminas de vidro com extremidade fosca foram secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. A contagem total de leucócitos e trombócitos foi realizada pelo método indireto (MARTINS et al., 2004) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Leucócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ leucócitos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sangüínea}}$$

$$\text{Trombócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ trombócitos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sangüínea}}$$

### *Contagem diferencial de leucócitos*

Para contagem diferencial das células de defesa (leucócitos) foram realizadas três extensões sangüíneas de cada animal em lâminas com extremidade fosca. As lâminas foram então secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em

microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. Foram contadas 100 células em cada lâmina, e o resultado expresso em % de cada tipo celular (linfócito, neutrófilo, monócito, eosinófilo e célula granulocítica especial) com relação ao número total de leucócitos observados na câmara de Neubauer (MARTINS et al., 2004).

#### *Proteína total plasmática*

Alíquotas de plasma foram separadas por centrifugação das amostras de sangue coletadas. A concentração total de proteína plasmática foi determinada através de um refratômetro portátil (WZ-301/Protein 0,0-12 g/dL).

#### *Glicose plasmática*

Alíquotas das amostras de sangue coletadas foram separadas em microtubos contendo fluoreto; o plasma foi separado por centrifugação e as amostras congeladas para posterior análise. A concentração de glicose plasmática foi determinada através do método enzimático utilizando kit laboratorial GLICOSE GOD-PAP Liquid Stable Mono – Reagente (LABORLAB<sup>®</sup>). Após descongelamento das amostras, 10 µL de plasma foram adicionados a 1.000 µL do reagente enzimático, incubados a 37 °C por 10 min. e a absorbância da amostra lida em espectrofotômetro no comprimento de onda 505 nm; o resultado foi expresso em mg/dL.

*Volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)*

As variáveis hematimétricas VCM, HCM e CHCM foram determinadas de acordo com Wintrobe (1934) através dos seguintes cálculos:

$$\text{VCM (fL)} = \frac{\text{Htc} \times 10}{\text{Eri}}$$

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{Eri}}$$

$$\text{CHCM (g dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{Htc}}$$

onde: Htc=hematócrito, Eri=número total de eritrócitos e Hb=concentração de hemoglobina.

#### *Microscopia óptica*

Para análise histológica, foi coletada a porção proximal do intestino dos peixes alimentados com a dieta controle e de peixes alimentados com dietas suplementadas com 0,4 e 1,5% de MOS. Imediatamente após a retirada do fragmento do tubo digestivo de cerca de três centímetros de comprimento, este foi lavado com solução salina 0,6% e fixado em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,2 por duas horas. Após esse período de fixação, os fragmentos de intestino foram lavados com solução tampão fosfato 0,1 M a pH 7,2 por três vezes e os fragmentos do tubo digestivo foram então cortados e fragmentos de menor tamanho, com cerca de um centímetro, submetidos ao processo de desidratação em concentrações crescentes de etanol, 30% até 100%, procedendo-se uma lavagem de dez minutos em cada concentração e três lavagens de dez minutos em etanol 100%. Após o processo de desidratação foi realizada a pré-infiltração dos tecidos em solução de resina glicol metacrilato (JB-4, Polyscience Inc.) diluída em etanol 100% na proporção 1:1, por quatro horas. Posteriormente os tecidos passaram para a resina pura até a inclusão do material em histomoldes, mergulhando-se os tecidos em resina plástica a temperatura ambiente.

Os blocos contendo os tecidos foram enviados para o Departamento de Morfologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Botucatu para corte e confecção das lâminas histológicas. Foram realizados cortes com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e corados pelo método da Hematoxilina-Eosina (HE), sendo montados em lâmina e lamínula. As lâminas montadas foram observadas em microscópio óptico de luz (Olympus BX-51) no aumento 4x. Os cortes histológicos foram fotografados utilizando-se uma câmera digital (Olympus DP71/12,5 megapixels) acoplada ao microscópio e as imagens analisadas pelo programa Image Pro Plus 6.1 para medida do perímetro das vilosidades intestinais.

#### *Procedimentos estatísticos*

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste *t* de comparação de médias ( $\alpha=0,05$ ) (STEEL; TORRIE, 1988) pelo PROC GLM SAS, (SAS Institute, 1985). Para análise da variância, algumas variáveis foram submetidas a transformações para que os valores adquirissem uma distribuição normal e homogeneidade da variância de acordo com a ferramenta SASLAB do aplicativo SAS (1985), como segue:

- $n^{\circ}$  de eritrócitos: elevado ao expoente -2:  $Eri^{(-2)}$
- concentração de glicose plasmática: logaritmo com base 10:  $\log_{10}[\text{Glic}]$
- concentração de hemoglobina corpuscular média: logaritmo com base 10:  $\log_{10}[\text{CHCM}]$
- volume corpuscular médio: elevado ao expoente 2:  $VCM^{(2)}$
- $n^{\circ}$  de leucócitos: logaritmo com base 10:  $\log_{10}(\text{Leu})$
- $n^{\circ}$  de linfócitos: raiz quadrada:  $\sqrt{\text{lin}}$
- $n^{\circ}$  de neutrófilos: logaritmo com base 10:  $\log_{10}(\text{Neu})$
- $n^{\circ}$  de eosinófilos: logaritmo com base 10:  $\log_{10}(\text{Eos} + 0,5)$
- $n^{\circ}$  de célula granulocítica especial: raiz quadrada:  $\sqrt{\text{cge} + 0,5}$
- conversão alimentar:  $\frac{1}{CA}$

#### 4.1.2 Resultados

##### *Parâmetros de qualidade de água*

Os parâmetros de qualidade de água (Tabela 12) mensurados durante o todo experimento se encontravam dentro dos valores ideais para sobrevivência da espécie segundo Urbinati e Gonçalves (2005).

Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante período experimental

Parâmetro	O <sub>2</sub> D	pH	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Condutividade	Temperatura
	mg/L		mg/L	-mV	°C
Média	6,10	7,67	0,5	48,86	28,7
Desvio Padrão	0,77	0,28	-	8,4	1,76

##### *Parâmetros de desempenho*

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de desempenho entre os peixes alimentados com as dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusão de MOS (Tabela 13).

Tabela 13 - Ganho de peso (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de sobrevivência (TS) do pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de MOS

MOS	Individual				
	GP	ICA	CR	TCE	TS
	g		g	%	%
0,0	47,2 ± 8,2	2,0 ± 0,04	108,5 ± 16,5	1,0 ± 0,21	100
0,2	45,4 ± 3,7	2,1 ± 0,01	95,8 ± 7,3	1,1 ± 0,06	100
0,4	51,1 ± 13,2	2,1 ± 0,21	105,5 ± 17,6	1,2 ± 0,22	100
0,6	45,1 ± 6,8	2,0 ± 0,09	92,9 ± 9,9	1,1 ± 0,12	100
0,8	40,2 ± 3,6	2,1 ± 0,14	87,5 ± 2,9	1,0 ± 0,05	100
1,0	58,7 ± 6,3	2,0 ± 0,03	117,8 ± 13,1	1,3 ± 0,10	100
1,5	56,9 ± 3,4	2,0 ± 0,07	116,2 ± 4,5	1,3 ± 0,06	100
2,0	50,0 ± 8,1	1,9 ± 0,2	96,2 ± 17,4	1,2 ± 0,13	100
ANOVA	0,100	0,405	0,070	0,109	

A análise de regressão para a taxa de crescimento específico foi significativa ( $p < 0,05$ ); SGR foi maior à medida que se aumentou o nível de suplementação de MOS (Figura 12), porém devido à variabilidade dos dados, o coeficiente de determinação da reta foi baixo.

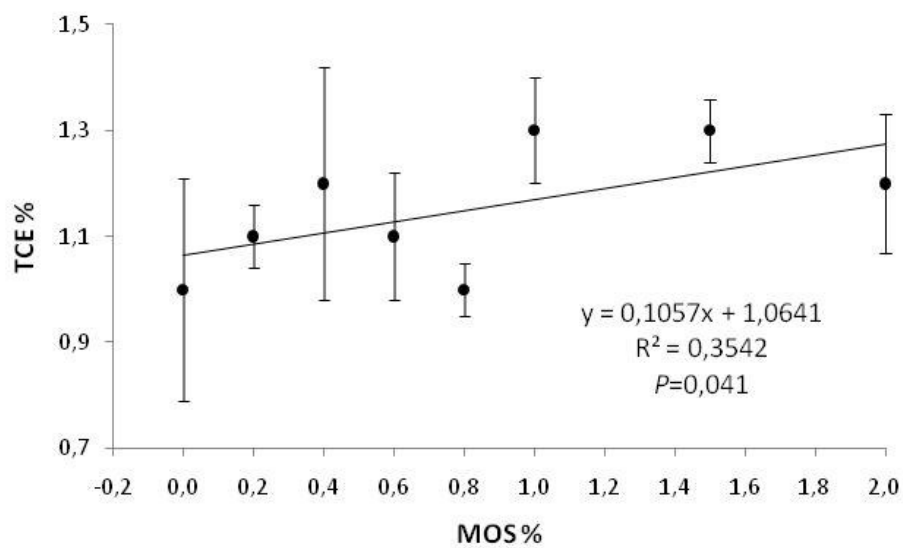


Figura 12 - Análise de regressão da taxa de crescimento específico do pacu *P. mesopotamicus* em relação aos níveis de suplementação de MOS na dieta

### *Parâmetros hematológicos e bioquímicos*

A análise de variância para os parâmetros hematológicos em relação aos tratamentos, tempos de coleta e a interação de ambos está representada na Tabela 14.



Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros hematológicos de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* para os tratamentos, tempos experimentais e interação entre os tratamentos e tempos experimentais de coleta ( $\alpha=0,05$ )

Variáveis	Valor de <i>p</i> para		
	Tratamento	Tempo	Tratamento X tempo
Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	0,016	<0,0001	0,285
Hemoglobina (g/dL)	0,235	0,046	0,121
Hematócrito (%)	0,089	<0,0001	0,277
VCM (fL)	0,119	<0,0001	0,861
HCM (pg/cel)	0,522	0,050	0,857
CHCM (g/dL)	0,047	0,0004	0,120
Proteína total (g/dL)	0,044	<0,0001	0,773
Glicose (mg/dL)	0,264	<0,0001	0,380
Trombócitos/ $\mu\text{L}$	0,768	0,0006	0,291
Leucócitos/ $\mu\text{L}$	0,198	<0,0001	0,520
Linfócitos/ $\mu\text{L}$	0,069	<0,0001	0,650
Monócitos/ $\mu\text{L}$	0,197	<0,039	0,753
Neutrófilos/ $\mu\text{L}$	0,001	<0,0001	0,503
Eosinófilos/ $\mu\text{L}$	0,097	<0,0001	0,363
CGE/ $\mu\text{L}$	0,747	<0,0001	0,010

Algumas variáveis hematológicas foram influenciadas pela inclusão de MOS na dieta (Tabela 14). O número total de eritrócitos e a concentração de proteína total plasmática foram influenciados pelos tratamentos ( $p<0,05$ ), porém nenhum dos níveis de inclusão de MOS diferiu estatisticamente do tratamento controle. A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) apresentou os maiores valores nos peixes alimentados com 1,0% de MOS na dieta ( $32,0 \pm 6,0$  g/dL) quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle ( $25,7 \pm 2,1$  g/dL). Semelhante aos resultados encontrados para a CHCM, o número de neutrófilos também foi significativamente maior nos peixes suplementados com 1,0% de inclusão de MOS quando comparados com o tratamento controle (Tabela 15).

Tabela 15 - Variáveis hematológicas ( $\mu \pm DP$ ) e bioquímicas ( $\mu \pm DP$ ) de juvenis de *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de MOS

MOS* %	Variável hematológica		
	Eritrócitos	Proteína total	Neutrófilos
	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	número/ $\mu\text{L}$
0,0	$1,75 \pm 0,12^{ab}$	$5,85 \pm 0,29^{ab}$	$606,4 \pm 252,5^b$
0,2	$1,87 \pm 0,25^{ab}$	$5,92 \pm 0,15^a$	$749,5 \pm 636,5^b$
0,4	$1,71 \pm 0,09^b$	$5,83 \pm 0,21^{ab}$	$601,0 \pm 412,7^b$
0,6	$1,89 \pm 0,20^{ab}$	$5,67 \pm 0,28^b$	$909,7 \pm 540,0^{ab}$
0,8	$1,96 \pm 0,22^a$	$5,76 \pm 0,20^{ab}$	$816,5 \pm 434,1^{ab}$
1,0	$1,83 \pm 0,39^{ab}$	$5,63 \pm 0,20^b$	$1308,6 \pm 786,7^a$
1,5	$1,92 \pm 0,19^{ab}$	$5,75 \pm 0,34^{ab}$	$1057,4 \pm 579,7^{ab}$
2,0	$1,85 \pm 0,18^{ab}$	$5,62 \pm 0,29^b$	$831,1 \pm 556,7^{ab}$

Diferentes letras superscritas na mesma coluna denotam diferenças estatísticas pelo teste *t* ( $\alpha=0,05$ ).

\*Mananoligossacarídeo – Active MOS® (Biorigin, Lençóis Paulista, SP)

Foi observado efeito significativo do tempo em todas as variáveis hematológicas e bioquímicas (Tabela 14). No decorrer do período experimental foi observado aumento significativo nos valores do hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração plasmática de glicose e número de trombócitos. No entanto, a concentração de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), o número total de leucócitos, assim como cada tipo leucocitário (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, célula granulocítica especial) mostraram queda significativa em seus valores durante o experimento. Já o número de eritrócitos aumentou até os 42 dias de experimento com subsequente queda até os 63 dias, enquanto que a concentração de proteína total plasmática sofreu queda até os 42 dias e aumento nos valores até os 63 dias de experimentação (Tabela 16).

Tabela 16 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos do pacu ( $\mu \pm DP$ ) aos 21, 42 e 63 dias de experimento

Variáveis	Dias de Experimento		
	21	42	63
Eri ( $10^6/\mu\text{L}$ )	$1,87 \pm 0,16^a$	$1,99 \pm 0,25^b$	$1,67 \pm 0,11^c$
Hb g/dL*	-	$9,8 \pm 1,7^a$	$9,0 \pm 0,4^b$
Htc %	$35,8 \pm 1,7^a$	$33,5 \pm 1,6^b$	$36,0 \pm 1,4^a$
VCM fL	$193,1 \pm 15,5^a$	$172,0 \pm 23,6^b$	$218,3 \pm 15,0^c$
HCM pg*	-	$50,1 \pm 9,3$	$54,9 \pm 4,9$
CHCM g/dL*	-	$29,6 \pm 5,9^a$	$25,1 \pm 1,1^b$
Prot mg/dL	$5,8 \pm 0,2^a$	$5,5 \pm 0,2^b$	$5,8 \pm 0,2^a$
Glic mg/dL	$49,3 \pm 6,8^a$	$51,7 \pm 7,2^a$	$75,5 \pm 9,4^b$
Leuc/ $\mu\text{L}$	$16700 \pm 3805^a$	$18657 \pm 5221^a$	$7367 \pm 2336^b$
Linf/ $\mu\text{L}$	$12487 \pm 3166^a$	$14988 \pm 3840^b$	$5311 \pm 2169^c$
Mon/ $\mu\text{L}$	$1584 \pm 623^a$	$1566 \pm 595^a$	$1198 \pm 481^b$
Neu/ $\mu\text{L}$	$1354 \pm 538^a$	$817 \pm 444^b$	$407 \pm 154^c$
Eos/ $\mu\text{L}$	$599 \pm 263^a$	$658 \pm 311^a$	$242 \pm 130^b$
CGE/ $\mu\text{L}$	$250 \pm 178^a$	$219 \pm 202^a$	$59 \pm 56^b$
Tromb/ $\mu\text{L}$	$35522 \pm 6489^a$	$43854 \pm 8960^b$	$41139 \pm 5412^b$

Diferentes letras sobrescritas na mesma linha denotam significância pelo teste  $t$  ( $\alpha = 0,05$ ).

\*Houve contaminação e descarte das amostras de hemoglobina referente à coleta aos 21 dias de experimento.

O número de células granulocítica especial apresentou interação significativa. A decomposição da interação demonstrou efeito dos tratamentos aos 42 dias de experimento, no qual os peixes suplementados com 1,5% de MOS na dieta apresentaram maior número em relação aos demais tratamentos (Figura 13). No decorrer do experimento, os animais alimentados com a dieta controle e com 1,0% suplementação de MOS apresentaram queda significativa no número de células. Já os peixes alimentados com 1,5% de MOS apresentaram aumento no número de células até os 42 dias com subsequente queda até os 63 dias (Figura 14).

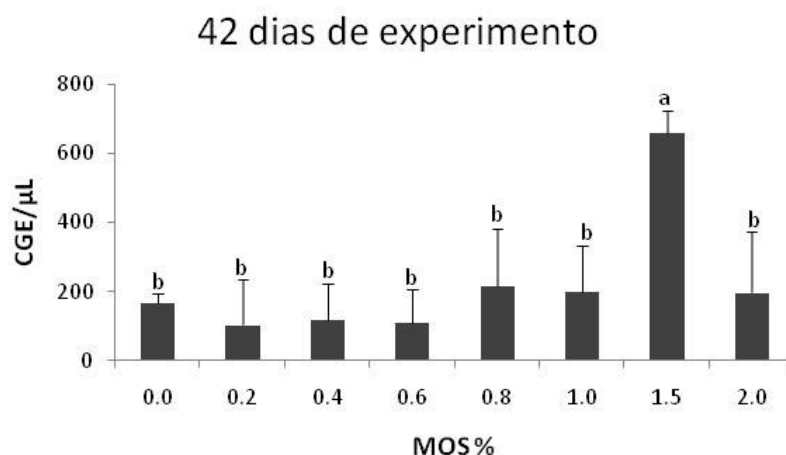


Figura 13 - Número total de célula granulocítica especial (CGE) do pacu *P. mesopotamicus* suplementados com diferentes níveis de inclusão de MOS na dieta ( $\mu \pm DP$ ) aos 42 dias de experimento. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste  $t$  ( $\alpha=0,05$ )

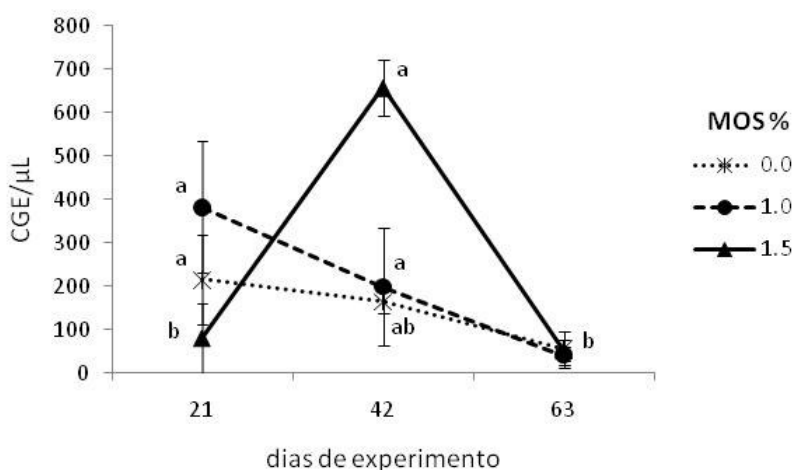


Figura 14 - Número total de célula granulocítica especial (CGE) de pacu *P. mesopotamicus* aos 21, 42 e 63 dias de experimento ( $\mu \pm DP$ ), suplementados com 0,0, 1,0 e 1,5% de MOS. Diferentes letras em cada linha denotam diferença estatística pelo teste  $t$  ( $\alpha=0,05$ )

### Histologia

Não foi observado efeito significativo ( $p>0,05$ ) da inclusão de 0,4 e 1,5% de MOS na dieta no perímetro total das vilosidades intestinais dos peixes quando comparados à dieta controle. Entretanto pôde-se observar maior perímetro das vilosidades, em valores absolutos, nos peixes suplementados com MOS ( $11673,6 \pm 2448 \mu\text{m}$  e  $10173,4 \pm 2439 \mu\text{m}$  com 0,4% e 1,5% de

suplementação, respectivamente) comparado aos animais sem suplementação ( $8586,6 \pm 2428 \mu\text{m}$ ) (Figura 15).

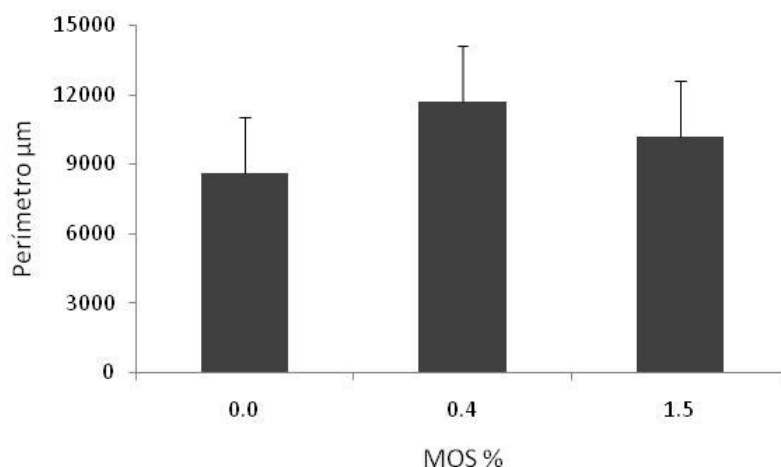


Figura 15 - Perímetro das vilosidades intestinais do pacu *P. mesopotamicus* alimentados com a dieta controle e suplementados com 0,4% e 1,5% de MOS

#### 4.1.3 Discussão

A adição de mananoligossacarídeo (MOS) à dieta do pacu não influenciou o GP, ICA e TCE. Entretanto, diversos estudos mostram que a adição de prebióticos na dieta melhora o desempenho e sanidade dos animais (BURRELLS; WILLIANS; FORNO, 2001; COUSO et al., 2003; LI; GATLIN, 2005; RAA, 2000; SAKAI, 1999). O MOS já é utilizado rotineiramente na nutrição e produção de suínos e aves (JUSKIEWICZ et al., 2002; NEWMAN; NEWMAN, 2001; OLIVEIRA et al., 2008; SANCHES et al., 2006; SPRING et al., 2000, YALÇINKAYA et al., 2008).

O uso de MOS dietético nos sistemas de produção de peixes e crustáceos tem ensejado melhores índices de desempenho. Aumento no ganho de peso e melhora nas respostas do sistema imunológico foram registrados em trutas arco-íris (STAYKOV et al., 2007), carpa comum (STAYKOV; DENEV; SPRING, 2005), robalo Europeu (TORRECILLAS et al., 2007), linguado *Scophthalmus maximus* (LI et al., 2008) camarão tigre *Penaeus semisulcatus* (GENC et al., 2007) e lagosta Européia, *Homarus gammarus* (DANIELS et al., 2006, 2007). A melhora dos índices de desempenho se deve ao fato do MOS ser uma glicomanoproteína não digerível derivada da

parede celular de cepas selecionadas de leveduras vivas, *Saccharomyces cerevisiae*, constituindo uma fonte rica em manose disponível para adesão bacteriana, que adsorvendo os patógenos impede sua ligação à parede intestinal (GOUVEIA et al., 2006; NEWMAN, 1994; VENDEMIATTI; COSTA; CYRINO, 2003). Quando a aderência das bactérias aos enterócitos é inibida, não há formação de colônias que possam indisponibilizar nutrientes para o animal ou infeccionar suas células intestinais (FERKET; PARKS; GRIMES, 2002), com isso há melhora da saúde intestinal, aumento da integridade das vilosidades intestinais e, conseqüentemente, um melhor aproveitamento dos nutrientes (LI et al., 2008; PELICANO et al., 2005). Contudo, semelhante aos resultados apresentados, Pryor et al. (2003) não encontraram diferença significativa nos parâmetros de desempenho do esturjão do México quando alimentados com dietas contendo 0,3% de MOS, em relação à dieta controle, assim como para o salmão do Atlântico *Salmo salar* alimentados com 1% de MOS na dieta (GRISDALE-HELLAND; HELLAND; GATLIN, 2008). Da mesma forma, tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 kg/t de ração por 35 dias (VENDEMIATTI; COSTA; CYRINO, 2003), 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% de inclusão na dieta por 45 dias (SADO; BICUDO; CYRINO, 2008) e 0,05; 0,1 e 0,2% de inclusão por 48 dias (GARCIA, 2008) não apresentaram melhora no ganho de peso ainda foi observada correlação negativa entre o ganho de peso (GARCIA, 2008; VENDEMIATTI; COSTA; CYRINO, 2003), consumo de ração (SADO; BICUDO; CYRINO, 2008) e taxa de crescimento específico (GARCIA, 2008) com os níveis de inclusão de MOS na dieta. Em lagostas Européias alimentadas com dietas suplementadas com 200 ppm de MOS, Daniels et al. (2006) observaram elevada taxa de mortalidade na fase juvenil e menor desenvolvimento morfológico para fase de crescimento VIII.

A suplementação de MOS na dieta, além de promover a melhora da saúde intestinal dos animais, confere maior desenvolvimento das vilosidades intestinais, aumentando a superfície de absorção dos nutrientes e conseqüentemente, traz melhoras no desempenho animal. Efeitos sobre a integridade e comprimento das vilosidades e área de absorção intestinais através da utilização de prebióticos foram documentados em aves, suínos e peixes. Frangos de corte suplementados com 0,1% de MOS dietético por 21 dias apresentaram aumento das vilosidades intestinais do jejuno (PELICANO et al., 2005) e superfície de absorção do duodeno (OLIVEIRA et al., 2008). Porém, quando Oliveira et al. (2008) continuaram a alimentar com as dietas suplementadas os animais dos 22 ao 42 dias de idade com 0,05% de MOS, maior superfície de absorção foi

observado somente no fleo. Porém, perus alimentados com dietas contendo 0,4% de oligossacarídeos (MOS, FOS e inulina) por 28 dias apresentaram menor desenvolvimento cecal quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle (JUSKIEWICZ et al., 2002). Em suínos alimentados com 0,1% de MOS na dieta por 77 dias (CHIQUIERI et al., 2007) ou 35 dias (SANCHES, 2004) não foi observado diferença significativa no comprimento das vilosidades intestinais do duodeno.

Não foi observada diferença ( $p>0,05$ ) no perímetro das vilosidades intestinais entre os peixes que receberam a dieta controle e aquelas suplementadas com 0,4 e 1,5% de MOS, apesar dos valores serem maiores, numericamente, nestes últimos. Em concordância com nossos resultados, também não foi observado diferença significativa na morfologia intestinal de esturjões do México alimentados com 0,3% de MOS na dieta por 28 dias (PRYOR et al., 2003) e robalo europeu alimentados com 0,2 e 0,4% por 67 dias (TORRECILLAS et al., 2007). A suplementação de 1,5; 3,0 e 4,0 g MOS/kg de ração por 48 dias em camarões tigre também não apresentou efeito sobre a histologia do hepatopâncreas, estrutura digestiva com função de absorção de nutrientes e produção de enzimas digestivas (GENC et al., 2007). Da mesma forma, tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo 3,0% de levedura íntegra ou 2,0% de levedura autolisada por 80 dias não apresentaram aumento do perímetro das vilosidades intestinais em relação à dieta controle, sendo que a inclusão de 1,0% de levedura íntegra até mesmo determinou menores valores em relação ao controle (HISANO et al., 2006). Na realidade, Olsen et al. (2001) observaram lesões no epitélio intestinal de *Salvelinus alpinus* alimentadas com 150 g inulina/kg dieta por 21 dias. A inulina, assim como os oligossacarídeos, é um carboidrato indigerível utilizado como prebiótico na nutrição animal e resultados promissores vêm sendo obtidos com o uso de prebióticos na dieta e saúde intestinal de animais aquáticos.

A análise ultra-estrutural do intestino médio de larvas de bijupirá (*Rachycentron canadum*) mostrou aumento no comprimento das vilosidades nos animais alimentados com rotíferos enriquecidos com 0,2% de MOS (SALZE et al., 2008). Hisano et al. (2006) também observaram aumento significativo do perímetro das vilosidades intestinais de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo 2,0% de levedura íntegra ou 0,1% de parede celular de levedura. Tilápias do Nilo mantidas em condições normais de produção em tanques-rede e alimentadas com dietas contendo 0,2% de MOS apresentaram menor profundidade de cripta intestinal em relação ao controle, o que indica menor descamação e renovação celular, porém não

foi observado efeito do tratamento no comprimento das vilosidades (GARCIA, 2008). Dada a diversidade de respostas encontradas na literatura sobre os efeitos prebióticos na morfologia intestinal, é importante ressaltar que o efeito sobre a arquitetura da parede intestinal depende não só do tempo de administração como também da dose utilizada e espécie animal.

O propósito da utilização de prebióticos com propriedades imunoestimulantes na aquicultura é promover aumento da resistência a doenças e melhora nos parâmetros de crescimento, incrementando a lucratividade dos sistemas de produção. Entretanto, os diversos resultados contraditórios encontrados na literatura demonstram que os mecanismos de ação desses compostos ainda não estão totalmente elucidados, principalmente quanto à dose e tempo e forma de administração, uma vez que o caráter dose e tempo-dependente das respostas podem causar efeitos deletérios ao animal.

A presença, a quantidade e a proporção das diferentes células no sangue periférico dos peixes refletem o estado fisiológico específico dos animais num dado momento ou período da vida (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Foi registrada influência dos níveis de inclusão de MOS em algumas variáveis hematológicas do pacu neste trabalho.

A avaliação dos parâmetros hematológicos relacionado com o uso de MOS dietético são escassos. Welker et al. (2007) não encontraram diferenças nos parâmetros hematológicos de bagre do canal alimentados com 2,0 g MOS/kg de dieta. Semelhante a esses resultados, Sado, Bicudo e Cyrino (2008) também não observaram diferenças nos parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo alimentadas com 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% de inclusão de MOS na dieta por 42 dias. Em relação a mamíferos e aves, não foram observadas influências nas variáveis hematológicas em cachorros alimentados com 2,0 g de MOS por animal (GOUVEIA et al., 2006), suínos suplementados com 0,1% por 77 dias (CHIQUEIRI et al., 2007) e perus alimentados com 1 g MOS/kg dieta por 15 semanas (ÇETIN; GÜÇLÜ; ÇETIN, 2005). O uso de levedura na dieta de peixes, com até 2,0% de inclusão, também não foi capaz de causar alteração nos parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo (HISANO; BARROS; PEZZATO, 2007). Por outro lado, a inclusão de derivados da parede celular de leveduras e fungos é capaz de modular determinadas variáveis hematológicas e bioquímicas em peixes e crustáceos (JENEY; JENEY, 2002; MISRA et al., 2006a, 2006b; SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1994; WANG; CHEN, 2005).



O número de eritrócitos diferiu significativamente entre os tratamentos, porém esses não diferiam do tratamento controle e se encontravam dentro dos valores normais para a espécie (RANZANI-PAIVA et al., 1998/1999; TAVARES-DIAS et al., 1999a, 1999b; TAVARES-DIAS, 2000). Da mesma forma, a concentração de proteína total plasmática diferiu entre os tratamentos, mas não dos animais alimentados com a dieta controle. O aumento na concentração de proteína total plasmática foi observado em trutas arco-íris alimentadas com prebióticos por sete dias (SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1994), *Labeo rohita* alimentadas por 28 e 42 dias (MISRA et al., 2006a) ou recebendo injeções intraperitoneais (MISRA et al., 2006b). A proteína total plasmática compreende diferentes peptídeos, como lisozima e fatores do complemento, também aumentados nos peixes suplementados, o que justificaria os maiores valores encontrados nos trabalhos anteriormente citados. Porém, tais análises não foram realizadas no presente estudo, o que poderia corroborar a maior concentração de proteína total nos peixes suplementados com 0,2% de MOS, mesmo que não diferente do controle ( $p>0,05$ ).

Em concordância com os resultados obtidos no presente experimento, Sado, Bicudo e Cyrino (2008) e Welker et al. (2007) também não observaram diferenças no número de leucócitos em tilápias do Nilo e bagre do canal, respectivamente, assim como o observado para suínos alimentados com dietas suplementados com MOS (CHIQUEIRI et al., 2007). No entanto, a suplementação de 100, 200 e 500 mg de glucanas por kg de dieta por 56 dias (MISRA et al., 2006a) em *L. rohita* ou quatro injeções consecutivas em intervalos de duas semanas promoveu aumento no número total de leucócitos (MISRA et al., 2006b).

Uma maior quantidade de leucócitos na circulação periférica e sua rápida renovação indicam uma maior proteção contra diferentes microrganismos patogênicos, os quais, consideravelmente, aparecem em maior número por unidade de volume quando comparado aos presentes no ambiente terrestre (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Na contagem diferencial de leucócitos, somente o número de neutrófilos apresentou efeito significativo dos tratamentos, sendo que a inclusão de 1,0% de MOS conferiu os maiores valores. Os neutrófilos, assim como os monócitos representam as células com capacidade fagocítica, sendo que os monócitos possuem a capacidade de migrar dos vasos sanguíneos para o foco inflamatório se diferenciando em macrófagos (MATUSHIMA; MARIANO, 1996; SADO; MATUSHIMA, 2007). Da mesma maneira, os neutrófilos têm a capacidade de responder a processos mórbidos, já

que seu número e capacidade fagocítica aumentam na presença de uma infecção bacteriana (SIWICKI; STUDNICKA, 1987).

Poucos são os trabalhos que se utilizam dos parâmetros hematológicos, como os índices hematimétricos absolutos e suas variáveis, na avaliação de imunoestimulantes. Porém a avaliação de alguns parâmetros imunológicos como lisozima, concentração de anticorpos (STAYKOV et al., 2007) e via alternativa do complemento (TORRECILLAS et al., 2007) têm sido utilizados na avaliação dos efeitos dos mananoligossacarídeos no sistema imune de peixes. A adição de MOS à dieta proporciona melhora nos parâmetros imunológicos como lisozima, atividade bactericida e concentração de anticorpos em peixes (STAYKOV et al., 2005, 2007; TORRECILLAS et al., 2007) e crustáceos (DANIELS et al., 2006, 2007). O aumento da atividade imunológica pode ser explicado pelo fato de que o sistema imune inespecífico dos peixes reconhece substâncias exógenas através de receptores presentes nas células de defesa, os quais identificam proteínas e moléculas características de microrganismos (polissacarídeos, lipopolissacarídeos, peptidoglicanas, DNA bacteriano e RNA viral) e que não são encontradas na superfície celular de organismos multicelulares (MAGNADÓTTIR, 2006). Sendo MOS um derivado da parede celular de leveduras, seria reconhecido pelo sistema imune e ativaria a produção de anticorpos, processo observado por Çetin et al. (2005) em perus suplementados com MOS na dieta.

Segundo Newman (2007) a parede celular de leveduras possui uma complexa estrutura de carboidratos e diferentes condições de fermentação, cepas e processamento podem alterar sua funcionalidade. Além disso, a concentração do produto, período de administração e população utilizada (idade, sexo, maturação gonadal) podem interferir nos resultados (PRYOR et al., 2003). Em peixes, especificamente, a influência dos fatores ambientais e individuais exerce relevante influência sobre sua fisiologia (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

A análise dos parâmetros hematológicos no decorrer do período experimental apresentou um perfil próximo ao encontrado em situações de estresse em sistemas intensivos de produção. Efeitos deletérios, como imunossupressão, em peixes alimentados com prebióticos foram descritos *in vivo* em douradas (COUSO et al., 2003) e *P. crocea* (AI et al., 2007) e *in vitro* em *Psetta maxima* e *S. aurata* (CASTRO et al., 1999). Ao mesmo tempo em que foi observada queda no número total de leucócitos e também na contagem diferencial dos mesmos, a possibilidade desse quadro hematológico ser um possível efeito tóxico do suplemento foi descartado, já que não houve diferença significativa dessas variáveis, nem do desempenho, entre os tratamentos.

Efeitos tóxicos sobre o crescimento e imunidade foram descritos em peixes suplementados com glucanas (SEALEY et al., 2008) e levamisol (LI; WANG; GATLIN, 2004; LI et al., 2006; MORRISSON; NOWAK; CARSON, 2001).

Mesmo a utilização de anestésico (benzocaína) para minimizar o estresse de captura e contenção pode ter sido mais uma fonte estressante aos animais, fato observado por Carneiro, Urbinati e Martins (2002) quando utilizaram benzocaína na tentativa de amenizar o estresse de transporte em matrinxãs.

O hematócrito representa o percentual do volume de sangue correspondente aos glóbulos vermelhos e seu aumento, observado a partir dos 42 dias de experimento, pode ser relacionado a condições estressantes (BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006) juntamente com parâmetros imunológicos e bioquímicos como a concentração de glicose plasmática (URBINATI; CARNEIRO, 2001). A resposta ao estresse é iniciada pelas interações do sistema imune com o sistema neuroendócrino, no que diz respeito à modulação do sistema imune pelos hormônios (HARRIS; BIRD, 2000). A resposta endócrina ao estresse é caracterizada pela hipersecreção de catecolaminas e cortisol, o que induz a rápida mobilização das reservas energéticas (REDDY et al., 1995; VIJAYAN; LEATHERLAND, 1989; VIJAYAN; PEREIRA; MOON, 1994). Este fato explica o aumento significativo dos níveis de glicose plasmática no decorrer do período experimental. Aumento na concentração de glicose plasmática também foi observado após estresse de captura em truta arco-íris (WELLS; PANKHURST, 1999), tilápia do Nilo (MARTINS et al., 2004), peixe dourado (DROR et al., 2006), “sablefish”, *Anoplopoma fimbria* (LUPES et al., 2006) e tambacu (*Colossoma macropomum* ♀ x ♂ *Piaractus mesopotamicus*) (MARTINS et al., 2002), e alta densidade em bagre indiano *Heteropneustes fossilis* (SRIVASTAVA; SAHAI, 1987). Peixes da espécie *L. rohita* suplementados com glucanas e submetidos a coletas consecutivas de sangue, como realizado no presente estudo não apresentaram diferença significativa nas concentrações de glicose plasmática no decorrer do experimento, sendo esse comportamento conferido, segundo os autores, ao manejo adequado de coleta e biometria dos peixes, e não à suplementação do prebiótico (MISRA et al., 2006a, 2006b).

Inúmeros trabalhos demonstram que o estresse ou a administração de cortisol em peixes diminui sua resistência a infecções bacterianas e fúngicas, sendo este efeito explicado em parte pela diminuição da quimiotaxia, fagocitose e produção de óxido nítrico pelos leucócitos, atividades importantes na resposta inflamatória (HARRIS; BIRD, 2000). O cortisol tem mostrado

a capacidade de reduzir o número de linfócitos B e T circulantes, ao passo que pode aumentar o número de fagócitos circulantes. Foi observado queda do número de leucócitos e, acompanhando essa mesma tendência, quedas nas concentrações de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e CGE. Queda na concentração de linfócitos foram descritas em peixes submetidos a um agente estressor (MARTINS et al., 2002, 2004; PULSFORD et al., 1994; SRIVASTAVA; SAHAI, 1987), porém, esses mesmos autores, ao contrário dos resultados aqui registrados, constataram aumento no número de neutrófilos e leucócitos totais.

O encontro de dados contraditórios no que diz respeito ao número de neutrófilos e leucócitos pode ser discutido no que diz respeito a tais diferenças ocorrerem porque a resposta é dependente da magnitude e duração do estresse, da espécie (PICKERING; POTTINGER; CHRISTIE, 1982; TAVRES-DIAS et al., 2001), do estado nutricional (PICKERING; POTTINGER; CHRISTIE, 1982) e do agente estressor (DAVIS; SCHRECK, 1997).

Alterações hematológicas em decorrência de fatores estressantes podem gerar um processo de hemoconcentração ou hemodiluição. Foi constatado processo de hemodiluição, já que houve queda no número de eritrócitos e concentração de hemoglobina a partir dos 42 dias de experimento. A hemodiluição ocorre em processos estressantes, por disfunção osmorregulatória (URBINATI; CARNEIRO, 2001). As mesmas características hematológicas também foram observadas em peixes da espécie *Scorpius violaceus* mantidos em confinamento (PANKHURST; WELLS; CARRACHER, 1992), tambaquis, *Colossoma macropomum* (TAVARES-DIAS et al., 2001). O volume dos eritrócitos, representado pelo volume corpuscular médio (VCM) sofreu queda até 42 dias de experimento, com subsequente aumento até o fim do ensaio (63 dias). A queda inicial dos valores de VCM corresponde aos baixos valores de hematócrito encontrados nesse período experimental. O aumento do VCM em peixes apresentando o quadro hematológico descrito também foi observado por Tavares-Dias et al. (2001) em tambaquis. O aumento do volume eritrocitário sugere processo de hidratação, já que a adrenalina, uma catecolamina liberada em situações de estresse, é capaz de causar tumefação de eritrócitos *in vitro* (NIKINMAA; HUESTIS, 1984) através da retenção de sódio e cloreto intracelular, aumentando sua concentração, gerando ganho de líquido por osmose e conseqüente aumento do volume eritrocitário (RAILO; NIKINMAA; SOIVO, 1985). A queda nos valores de CHCM foi conseqüência da diminuição da concentração de hemoglobina.

A proteína plasmática diminuiu até 42 dias de experimento, retornando aos valores iniciais daí até o fim do experimento. A proteína plasmática pode ser relacionada a uma série de fatores estressantes (PANKHURST; DEDUAL, 1994). Porém, Wells e Pankhurst (1999) não definiram qualquer relação entre as concentrações de proteína plasmática e estresse de captura e densidade em trutas arco-íris. Da mesma forma, no presente trabalho não foi possível determinar as causas do comportamento dos dados. A suplementação de 100, 250 e 500 mg/kg de ração por 28, 42 e 56 dias ou injeção intraperitoneal na dose de 5; 10 e 15 mg/kg de peso vivo conferiu maior concentração de proteína total em *L. rohita* (MISRA et al., 2006a, 2006b). O acréscimo dos valores de proteína total encontrado nos trabalhos anteriormente citados corresponde ao aumento do status imunológico dos peixes, visto que lisozima e fatores do complemento fazem parte da proteína total plasmática, sendo esses fatores aumentados quando os peixes foram suplementados com  $\beta$ -glucanas na dieta ou por injeção intraperitoneal. Porém, no presente estudo não foram mensurados tais parâmetros para que se possa afirmar que o aumento dos valores a partir dos 42 dias de experimento foi devido ao aumento dessas proteínas. Entretanto, Bagni et al. (2005) não relacionaram o aumento da lisozima sérica e fatores do complemento à possíveis variações na concentração de proteína total plasmática, já que observaram aumento dessas proteínas em robalos Europeu (*Dicentrarchus labrax*) suplementados com glucanas, porém sem diferença significativa nas concentrações de proteína total plasmática.

## 4.2 Conclusão

A adição de MOS na dieta não apresentou efeito prebiótico e capacidade de minimizar os efeitos do estresse de manejo no pacu. Estudos com relação à caracterização da microbiota intestinal do pacu são necessários para determinar os mecanismos de ação que regem e seu efetivo uso do suplemento como prebiótico para a espécie.

## Referências

AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 22, p. 394-402, 2007.

- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M.G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P.G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 18, p. 311-325, 2005.
- BLAXHALL, P.C.; DAISLEY, K.W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, p. 771-781, 1973.
- BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.V.; CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.
- BURRELLS, C.; WILLIAMS, P.D.; FORNO, P.F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. 1. Effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**, Oxford, v. 199, p. 159-169, 2001.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C.; MARTINS, M.L. Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 555-560, 2002.
- CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of different  $\beta$ -glucans on the respiratory burst of tuebot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, n. 9, p. 529-541, 1999.
- CHIQUIERI, J.; SOARES, R.T.R.N.; NERY, V.L.H.; CARVALHO, E.C.Q.; COSTA, A.P.D. Bioquímica sanguínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. **Brazilian Journal of Animal Health and Production**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 97-104, 2007.
- COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARIÑOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. **Aquaculture**, Oxford, v. 219, p. 99-109, 2003.
- ÇETIN, N.; GÜÇLÜ, B.K.; ÇETIN, E. The effects of probiotic and mannanoligosaccharide on some haematological and immunological parameters in turkeys. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. A52, p.263-267, 2005.
- DANIELS, C.; BOOTHROYD, D.; DAVIES, S.; PRYOR, R.; WELLS, C. Developing & understanding the use of pre-biotics in homarid lobster culture. **Aquaculture Health International**, Manukau, v. 8, p. 32-35, 2007.
- DANIELS, C.; BOOTHROYD, D.; DAVIES, S.; PRYOR, R.; TAYLOR, D.; WELLS, C. Bio-Mos<sup>®</sup> improves growth and survival of cultured lobsters. **Shellfish News**, Padstow, v. 21, p. 23-25, 2006.

DAVIS, E.L.; SCHRECK, C.B. The energetic response to handling stress in juvenile coho salmo. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 126, p. 248-258, 1997.

DROR, M.; SINYAKOV, M.S.; OKUN, E.; DYM, M.; SREDNI, B.; AVTALION, R.R. Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 109, n. 3-5, p. 279-287, 2006.

FERKET, P.R., PARKS, C.W.; GRIMES, J.L. Mannan oligosaccharides *versus* antibiotics for turkeys. In: ALLTECH'S EIGHTEENTH ANNUAL SYMPOSIUM, 18., 2002, Nottingham. **Nutritional biotechnology in the feed and food industry: proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 43-63.

GARCIA, F. **Suplementação alimentar com  $\beta$ -glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. 2008. 100 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, Oxford, v. 180, p. 147-165, 1999.

GATLIN III, D.M.; LIL, P.; WANG, X.; BURR, G.S.; CASTILLE, F.; LAWRENCE, A.L. Potential application of prebiotics in aquaculture. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 8., 2006, Monterrey **Avances en nutrición acuícola: memórias...** Monterrey: Universidade Autónoma de Nuevo León, 2006. p. 371-376

GENC, M.A.; AKTAS, M.; GENC, E.; YILMAZ, E. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 13, p. 156-161, 2007.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 56, p. 35-39, 1971.

GOUVEIA, E.M.F.; SILVA, I.S.; ONSELEM, V.J.V.; CORRÊA, R.A.C.; SILVA, C.J. Use of mannanoligosaccharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and its effects on *E. coli* inactivated in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 4, p. 23-26, 2006.

GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S.J.; GATLIN III, D.M. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharides, fructooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Oxford, v. 283, p. 163-137, 2008.

HARRIS, J.; BIRD, D.J. Modulation of the immune system by hormones. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Philadelphia, v. 77, p. 163-176, 2000.

HISANO, H.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 35-42, 2007.

HISANO, H.; SILVA, M.D.P.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 311-318, 2006.

JENEY, G.; JENEY, Z. Application of immunostimulants for modulation of the non-specific defense mechanisms in sturgeon hybrid: *Acipenser ruthenus* x *A. baerii*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 18, p. 416-419, 2002.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, Oxford, v. 222, p. 277-287, 2003.

JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z.; JANHOWSKI, J.; KRÓL, B. Caecal metabolism in young turkeys fed diets supplemented with oligosaccharides. **Archive Geflügelk**, Stuttgart, v. 66, n. 5, p. 206-210, 2002.

LI, G.; GUO, Y.; ZHAO, D.; QIAN, P.; SUN, J.; XIAO, C.; LIANG, L.; WANG, H. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, Oxford, v. 253, p. 212-217, 2006.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluation of the prebiotic GroBiotic<sup>®</sup>-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. **Aquaculture**, Oxford, v. 248, p. 197-205, 2005.

LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D.M. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid striped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, and elevated levamisole *in vitro* impairs macrophage function. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 1380-1383, 2004.

LI, Y., WANG, Y.J.; WANG, L.; JIANG, K.Y. Influence of several non-nutrient additives on nonspecific immunity and growth of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p. 387-395, 2008.

LUPES, S.C.; DAVIS, M.W.; OLLA, B.L.; SCHRECK, C.B. Capture-related stressors impair immune system function in sablefish. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 135, p. 129-138, 2006.

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

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; NOMURA, D.T.; FENERICK, J. Respostas do híbrido tambacú (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 195-204, 2002.



MARTINS, M.L.; PILARSKI, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr, J.; RIBEIRO, K.; MIYAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.

MATUSHIMA, E.R., MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, Oxford, v. 255, p. 82-94, 2006a.

\_\_\_\_\_. Effect of multiple injections of  $\beta$ -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 305-319, 2006b.

MORRISON, R.N.; NOWAK, B.F.; CARSON, J. The Histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Oxford, v. 195, p. 23-33, 2001.

NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, Champaign, v. 31, p. 735-738, 1952.

NEWMAN, K. Mannan-oligosaccharides: natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. In: SEVENTEENTH ANNUAL SYMPOSIUM, 17., 1994, Nicholasville. **Science and technology in the feed industry: proceedings...** Nicholasville: Alltech, 1994. p. 167-174.

\_\_\_\_\_. Form follows function in picking MOS product. **Feedstuffs**, Minnetonka v. 79, n. 4, p. 1-2, 2007.

NEWMAN, K.E.; NEWMAN, M.C. Evaluation of mannan oligosaccharide on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, suppl. 1, p. 189, 2001.

NIKINMAA, M.; HUESTIS, W.H. Adrenergic swelling of nucleated erythrocytes: cellular mechanism in a bird, domestic goose, and two teleost, striped bass and rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, Washington, v. 113, p. 215-224, 1984.

OLIVEIRA, M.C.; MARQUES, R.H.; GRAVENA, R.A.; MORAES, V.M.B. Morfometria do intestino delgado de frangos tratados com dietas adicionadas de mananoligossacarídeo e complexo enzimático. **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 3, p. 135-142, 2008.

- OLSEN, R.E.; MYKLEBUST, R.; KRYVI, H.; MAYHEW, T.M.; RINGO, E. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, p. 931-934, 2001.
- PANKHURST, N.W.; DEDUAL, M. Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate, gonadal steroids in a natural population of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 1013-1025, 1994.
- PANKHURST, N.W.; WELLS, R.M.G.; CARRACHER, J.F. Effects of stress on plasma cortisol levels and blood viscosity in blue mao mao, *Scorpius violaceus* (Hutton), a marine teleost. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 101A, n. 2, p. 335-339, 1992.
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; FIGUEIREDO, B.F.; BOIAGO, M.M.; CARVALHO, S.R.; BORDON, V.F. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 7, n. 4, p. 221-229, 2005.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CHRISTIE, P. Recovery of the trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: A time-course study. **Journal of Fish Biology**, London, v. 24, p. 731-740, 1982.
- PLUMB, J.A. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. Ames: The Iowa State University Press, 1999. 328p.
- PRYOR, G.S.; ROYES, J.B.; CHAPMAN, F.A.; MILES, R.D. Mannan oligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico Sturgeon. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 65, p. 106-111, 2003.
- PULSFORD, A.L.; LEMAIRE-GONY, S.; TOMLINSON, M.; COLLINGWOOD, N.; GLYNN, P.J. Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 109C, n. 2, p. 129-139, 1994.
- RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Avances em nutrição acuícola: memórias...** Mérida, 2000. p. 47-56.
- RAILO, E.; NIKINMAA, M.; SOIVO, A. Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gardneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, London, v. 26, p. 725-732, 1985.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, E.A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.S.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. cap. 4, p. 89-120.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, F.A.; EIRAS, J.C.; EIRAS, A.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A.C. Análises hematológicas de curimbatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 77-83, 1998/1999.

REDDY, P.K.; VIJAYAN, M.M.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout? **Journal of Fish Biology**, London, v. 46, p. 341-59, 1995.

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

SADO, R.Y.; MATUSHIMA, E.R. Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e ultra-estrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus spp.*) ao BCG. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, p. 58-64, 2007. Supplement.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile nile tilapia, *Oreochromis niloticus* have no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, 2008. In press.

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

SALZE, G.; McLEAN, E.; SCHWARZ, M.H.; CRAIG, S.R. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. **Aquaculture**, Oxford, v. 274, p. 148-152, 2008.

SANCHES, A.L. **Probiótico, prebiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame**. 2004. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2004.

SANCHES, A.L.; LIMA, J.A.F.; FIALHO, E.T.; MURGAS, L.D.S.; ALMEIDA, E.C.; NETO, J.V.; FREITAS, R.T.F. utilização de probiótico, prebiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 774-777, 2006.

SAS INSTITUTE. **Statistical guide for personal computers**. 5<sup>th</sup> ed. Cary, 1985. 956p.

SEALEY, W.M.; BARROWS, F.T.; HANG, A.; JOHANSEN, K.A.; OVERTURF, K.; LaPATRA, S.E. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of  $\beta$ -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 141, p. 115-128, 2008.

SHEPHERD, J. Fish health and disease. In: SHEPHERD, J.; BROMAGE, N.R. (Ed). **Intensive fish farming**. Oxford: Blackwell Science, 1992. p. 198-238.

SIWICKI, A.; STUDNICKA, M. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 31, p. 57-60, 1987.

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

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 205-211, 2000.

SRIVASTAVA, A.K.; SAHAI, I. Effects of loading density on carbohydrate metabolism and hematology in the Indian freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 66, p. 275-286, 1987.

STAYKOV, Y.; DENEV, S.; SPRING, P. Influence of dietary mannan oligosaccharides (Bio-Mos®) on growth rate and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: HOWAL, B.; FLOS, R. (Ed.). **Lessons from the past to optimize the future**. Oostende, European Aquaculture Society, 2005. p. 431-432. (Special Publication, 35).

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. Effect of mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, London, v. 15, p. 153-161, 2007.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 569 p.

TACON, A.G.J. **Standard methods for the nutrition of farmed fish and shrimp**. Seattle: Argent Laboratories Press, 1990. 208 p.

TAVARES-DIAS, M. **Estudos parasitológico e hematológico em peixes oriundos de “pesque-pagues” do município de Franca, São Paulo**. 2000. 130 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.

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

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 43-48, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 16, p. 423-431, 1999b.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R.; PERRECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, n. 2, p. 337-342, 1999a.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, R.J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M.S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 23, p. 969-981, 2007.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. cap. 10, p. 225-255.

URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleost: Characidae) to transport stress under influence benzocaína. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, Calcutta, v. 16, n. 1, p. 75-85, 2001.

VENDEMIATTI, J.A.; COSTA, A.B.; CYRINO, J.E.P. Mananoligossacarídeos alimentares (MOS) como agentes profiláticos das infecções por *Edwardsiella tarda* em tilápia do Nilo. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2003, Zaragoza. **Anales...** Zaragoza, Universidad de Zaragoza, 2003. p. 123-140. Disponível em: <<http://www.CIVA2003.org>>. Acesso em: 15 mar. 2005.

VIJAYAN, M.M.; LEATHERLAND, J.F. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). **Canadian Journal of Zoology**, Toronto, v. 67, p. 2746-50, 1989.

VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, M.C.; MOON, T.W. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 108C, p. 321-9, 1994.

WANG, S.H.; CHEN, J.C. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 19, p. 191-204, 2005.

WELKER, T.L.; LIM, C.; YILDRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P.H. Immune responses and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 38, n. 1, p. 24-35, Mar. 2007.

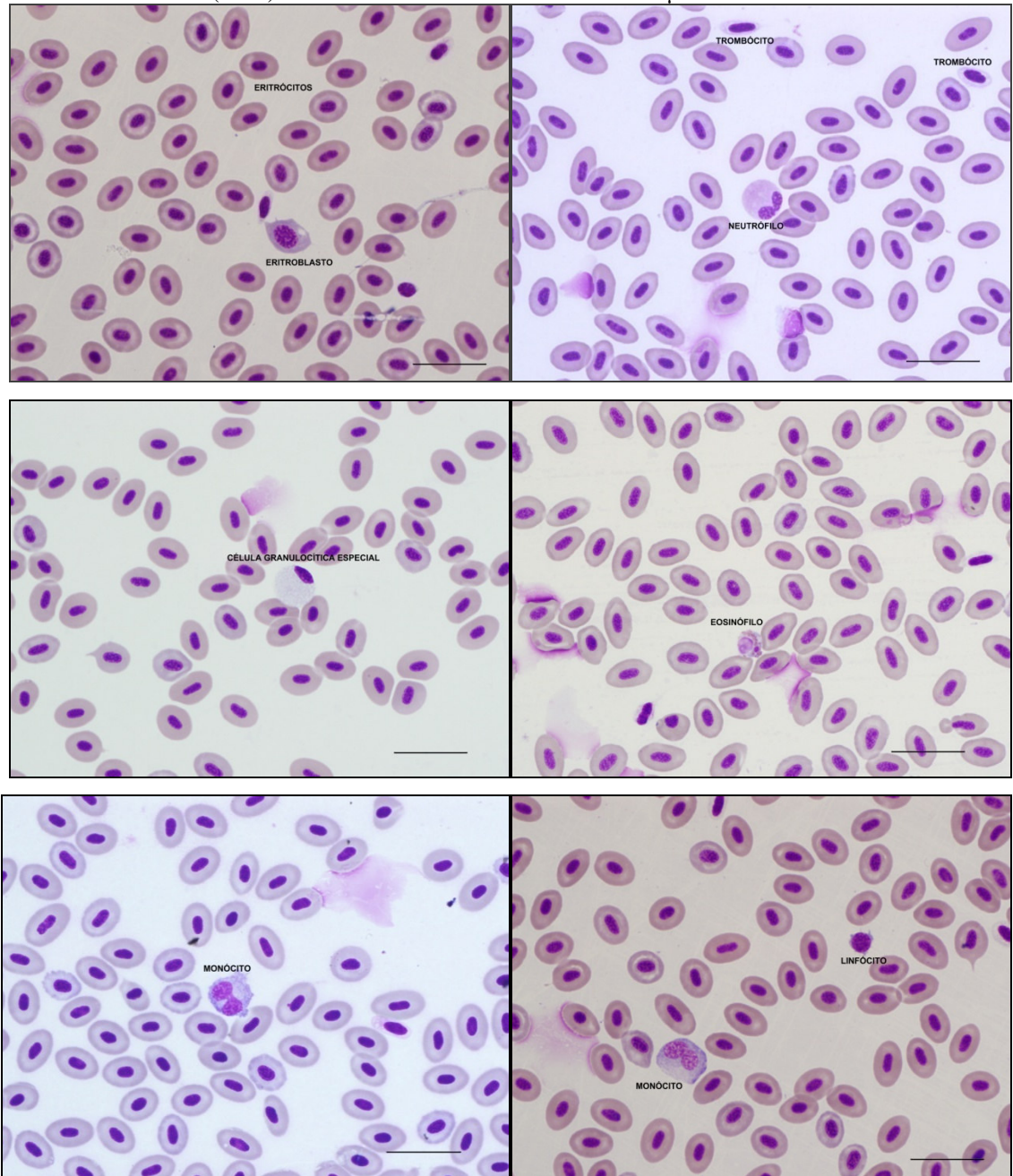
WELLS, R.M.; PANKHURST, N.W. Evaluation of simple instrument for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 30, n. 2, p. 276-283, 1999.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v. 51, p. 32-49, 1934.

YALÇINKAYA, I; GÜNGÖR, T.; BASALAN, M.; ERDEM, E. Mannan oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* in broilers: effects on performance and blood biochemistry. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, Ankara, v. 32, n. 1, p. 43-48, 2008.

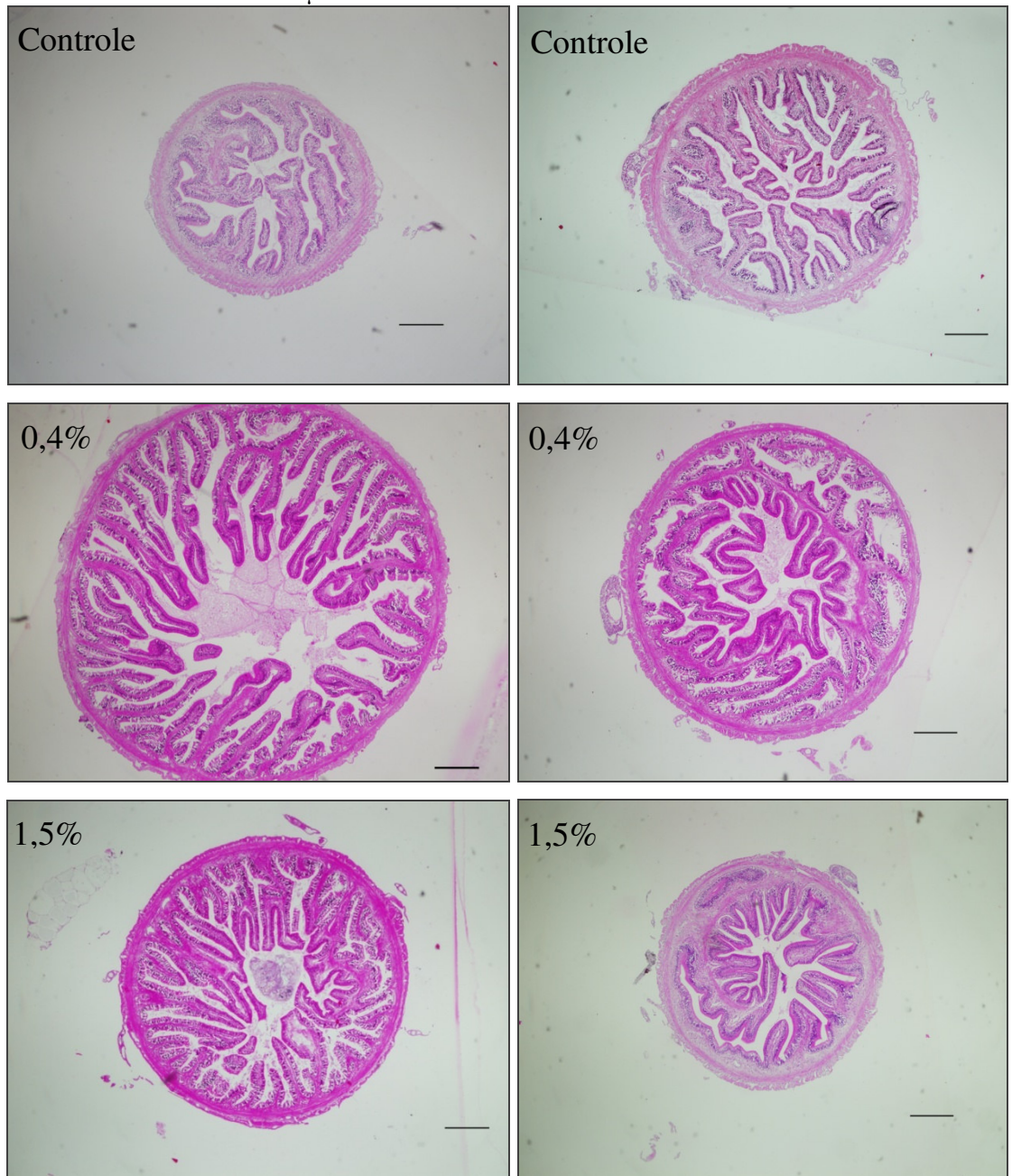
**ANEXOS**

ANEXO A – Fotomicrografias de extensões sanguíneas de pacu, *P. mesopotamicus* coradas pelo método de Rosenfeld (1947). Aumento 10.000x. Barra de escala = 10µm





ANEXO B – Fotomicrografia da porção proximal do intestino de pacu, *P. mesopotamicus* alimentados com a dieta controle e suplementados com 0,4 e 1,5% de MOS. Aumento de 4x. Coloração H & E. Barra de escala = 150 $\mu$ m



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)