

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**CAMPUS DE DRACENA**

**INFLUÊNCIA DE CARBOIDRATOS NA HOMEOSTASE**  
**FISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE JUVENIS DE**  
**SURUBINS (*Pseudoplatystoma* sp.)**

**Luana Camargo Sousa**  
Bióloga

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS  
CAMPUS DE DRACENA

**INFLUÊNCIA DE CARBOIDRATOS NA HOMEOSTASE  
FISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE JUVENIS DE  
SURUBINS(*Pseudoplatystoma* sp.)**

**Luana Camargo Sousa**

**Orientador: Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi  
Co-orientadora: Profa. Dra. Jaqueline D. Biller-Takahashi**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – FCAT – Unesp, Campus de Dracena, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

S725i

Sousa, Luana Camargo.

Influência de carboidratos na homeostase fisiológica e imunológica de juvenis de surubins (*Pseudoplatystoma* sp.) / Luana Camargo Sousa. -- Dracena: [s.n.], 2016.  
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.  
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena.  
Área do conhecimento: Produção Animal, 2016.

Orientador: Leonardo Susumu Takahashi  
Inclui bibliografia.

1. Metabolismo energético. 2. Nutrição animal. 3. *Pseudoplatystoma* sp. 4. Sistema imune não específico. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Influência de carboidratos na homeostase fisiológica e imunológica de juvenis de surubins (*Pseudoplatystoma sp.*)

AUTORA: LUANA CAMARGO SOUSA

ORIENTADOR: LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER TAKAHASHI  
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

  
Prof. Dr. DANIEL NICODEMO  
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

  
Dr. DENILSON BURKERT  
Departamento de Aquicultura / APTA - ALTA PAULISTA - ADAMANTINA/SP

Ilha Solteira, 20 de janeiro de 2016

## **DADOS CURRICULARES DO ALUNO**

**LUANA CAMARGO SOUSA** – Nascida em Ilha Solteira, SP. No ano de 2012, concluiu sua graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no município de Dourados, MS. No ano seguinte, iniciou estágio voluntário na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, no Departamento de Biologia e Zootecnia, auxiliando os alunos da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal no desenvolvimento de seus projetos de Mestrado. Atualmente, é discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – UNESP Campus de Dracena, sendo que em janeiro do ano de 2016 submeteu sua dissertação à banca examinadora.

*“Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.*

**Dalai Lama**

## DEDICATÓRIA

*“Aos meus pais, pelo imensurável amor, carinho, educação e confiança”.*

*“À minha avó materna, por estar sempre me encorajando a continuar meu caminho e me apoiando em todas as minhas decisões”.*

*À minha irmã, por todo apoio, todos os conselhos e todo amor do mundo nas horas mais difíceis”.*

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por guiar meus passos, não me deixar fraquejar perante os desafios que a vida nos impõe e pelas graças concedidas todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, por me proporcionarem sempre o melhor incentivo, apoio, conselho e guiarem meus passos, nunca permitindo que me sentisse só.

A minha avó que sempre esteve ao meu lado nos piores momentos, fazendo suas orações por mim e protegendo meus caminhos, com muito amor.

A minha irmã por sempre disponibilizar seus ouvidos, sua paciência e seus grandes conselhos a mim, sendo meu maior exemplo de vida e de amor.

A todos os meus amigos Beatriz Gabardo, Lucas Zanforlin, Gabriel Gulli, Eduardo Freitas, Danielle Floriano Fachiolli, Rafaela Saes, Isabela Saes, Thamilis Menezes, Robert Guaracy, Marco Aurélio, Daniel Watanabe, André Nagatani, Natalia Há e André Nascimento por sempre serem compreensivos com a minha personalidade, e mesmo assim continuarem me apoiando e me incentivando, e principalmente por todos os conselhos levados a mim, todas as palavras de incentivo e todos os momentos de descontração que sempre foram importantíssimos para mim.

Aos grandes amigos e colegas do GAUD, Grupo de Aquicultura da UNESP de Dracena, que mais que companheiros de trabalho, se tornaram grandes amigos pessoais e grandes incentivadores do meu trabalho, estando sempre ali com uma palavra amiga para confortar nos momentos de dificuldade e por me proporcionarem muitos momentos divertidos que lembrarei com muito carinho sempre.

Ao Professor Doutor Leonardo Susumu Takahashi por toda orientação durante esses dois anos de Mestrado, e por além de conteúdos acadêmicos, ter me ensinado a progredir como pessoa e ter sempre humildade para alcançar nossos objetivos.

À Pesquisadora Dr. Jaqueline D. Biller-Takahashi por toda orientação, estando sempre presente nos momentos em que desenvolvi o projeto e por ter se tornado um exemplo de caráter, personalidade e profissionalismo.

A todos os Professores Doutores da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas do Campus de Dracena e da Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira, por todo auxílio científico à minha pesquisa, e principalmente todo carinho, conselhos, respeito e compreensão de 'pais e mães' durante todos esses anos.

A Tarsilaine, secretária da coordenação do curso de Zootecnia, por todo apoio e carinho, e por ter se tornado uma grande amiga e uma grande incentivadora todos esses anos.

Aos técnicos de laboratório Wanderson, Edson, Ariane, Eloísa, Miriam, Seu João e Lucas da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas do Campus de Dracena, por toda ajuda na realização das minhas análises e por serem sempre fiéis conselheiros de vida.

MUITÍSSIMO OBRIGADA.

# CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus Experimental de Dracena



## Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA)

### Certificado

Certificamos que o Projeto intitulado **"Influência de carboidratos dietéticos na homeostase fisiológica e imunológica de juvenis de surubins (*Pseudoplatystoma sp*)"**, protocolo nº 33/2014, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Curso de Zootecnia da UNESP de Dracena e foi aprovado pela referida Comissão.

Dracena, 06 de maio de 2014.

Prof.ª Dra. Sirlei Aparecida Maestá  
Presidente da CEUA - UNESP Dracena

**INFLUÊNCIA DE CARBOIDRATOS DIETÉTICOS NA HOMEOSTASE  
FISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE JUVENIS DE SURUBINS  
(*Pseudoplatystomasp.*)**

**RESUMO**– O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência de dietas com diferentes níveis de proteína (P) e carboidratos (CH) na resposta imunológica e nos índices zootécnicos de juvenis de surubim (*Pseudoplatystomasp.*). O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Unesp – Campus de Dracena, distribuído em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições (38P/22CH; 38P/26CH; 38P/30CH; 42P/22CH; 42P/26CH; 42P/30CH). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Duncan (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.0. Não foram observadas diferenças significativas entre as dietas para os parâmetros de desempenho: ganho em biomassa, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e taxa de eficiência protéica. Os grupos alimentados com a dieta 38P/22CH obtiveram melhor desempenho para comprimento padrão, peso final e ganho de peso. Não foram observadas diferenças significativas em albumina, atividade respiratória dos leucócitos e atividade hemolítica complemento. A dieta 38P/30CH obteve valores médios significativamente maiores para as concentrações de proteína, globulina e lisozima. Para os parâmetros hematológicos, entre as dietas, não houve diferença significativa para as concentrações de eritroblasto, linfócito, eosinófilo, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média. Após serem desafiados, os peixes apresentaram uma resposta significativa na concentração de hemoglobina, e uma redução no hematócrito, em resposta ao estresse causado pelo desafio. A melhor resposta produtiva foi observada nos peixes que receberam a dieta 38P/22CH. As condições fisiológicas não foram comprometidas mostrando a capacidade dos peixes em responder ao desafio com LPS.

**Palavras-chave:** metabolismo energético; nutrição animal; *Pseudoplatystoma* sp.; sistema imune não específico.

**CARBOHYDRATES DIETARY INFLUENCE ON HOMEOSTASIS  
PHYSIOLOGICAL AND IMMUNE OF SURUBIM  
JUVENILE(*Pseudoplatystoma* sp.)**

**ABSTRACT** - This study aimed to evaluate the influence of diets with different protein levels (P) and carbohydrates (CH) in the immune response and growth performance of juvenile surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). The experiment was conducted in the Aquaculture Laboratory - Unesp Dracena, distributed in a completely randomized design with six treatments and four replications (38P/22CH; 38P/26CH; 38P/30CH; 42P/22CH; 42P/26CH; 42P/30CH). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Duncan test (5%), through the SAS statistical software, version 9.0. No significant differences were observed among diets regarding the growth performance parameters: weight gain, specific growth rate, feed conversion and protein efficiency ratio. Fish fed diets with 38P/22CH diet performed better for standard length, body weight and weight gain. There were no significant differences in albumin, respiratory activity of leukocytes and complement hemolytic activity. The 38P/30CH diet achieved significantly higher average values for the concentrations of protein, globulin and lysozyme. For hematological parameters, there were no significant difference in the concentrations of erythroblast, lymphocytes, eosinophils, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin. After being challenged fish showed a significant response in hemoglobin concentration, and a decrease in hematocrit in response to stress caused by challenge. The best productive response was observed in fish fed diet 38P / 22CH. Physiological conditions were not compromised showing the ability of fish to respond to LPS challenge.

**Keywords:** energy metabolism; animal nutrition; *Pseudoplatystoma* sp .; non-specific immune system.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios, erro padrão (SEM) e valor de P dos parâmetros de desempenho produtivo do surubim ( <i>Pseudoplatystoma</i> sp.) após 60 dias de alimentação com diferentes proporções de proteína/carboidrato na dieta. ....	44
Tabela 2. Valores médios, erro padrão (SEM) e valores de P dos parâmetros imunológicos do surubim ( <i>Pseudoplatystoma</i> sp.) após 60 dias de alimentação com diferentes proporções de proteína/carboidrato na dieta e desafio com LPS. ....	45
Tabela 3. Valores médios, erro padrão (SEM) e valores de P dos parâmetros hematológicos do surubim ( <i>Pseudoplatystoma</i> sp.) após 60 dias de alimentação com diferentes proporções de proteína/carboidrato na dieta e desafio com LPS. ....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do surubim híbrido ( <i>Pseudoplatystoma sp</i> ).....	19
Figura 2: Valores médios de Hemoglobina (g/dL-1) dos híbridos de surubim ( <i>Pseudoplatystoma sp</i> ) alimentados com diferentes níveis de relação carboidrato/proteína na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Duncan( $p<0,05$ ). 47	47
Figura 3: Valores médios de Hematócrito (%) dos híbridos de surubim ( <i>Pseudoplatystoma sp</i> ) alimentados com diferentes níveis de relação carboidrato/proteína na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Duncan ( $p<0,05$ ). .....	48

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>1</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Sistema imunológico dos peixes .....	4
2.1.1 Imunidade humoral.....	6
2.1.2 Imunidade celular .....	7
2.1.2.1 Linfócitos .....	7
2.1.2.2 Neutrófilos.....	8
2.1.2.3 Basófilos e Eosinófilos .....	8
2.1.2.4 Monócitos e Macrófagos.....	9
2.1.2.5 Células Citotóxicas.....	9
2.2. Lipopolissacarídeo (LPS) .....	10
2.3 A Imunidade e a nutrição dos peixes. ....	12
2.4 Peixes e o metabolismo energético .....	14
2.5 Digestão e absorção de carboidratos em peixes.....	16
2.6 Modelo biológico - <i>Pseudoplatystoma sp.</i> .....	18
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>28</b>
<b>INFLUÊNCIA DE CARBOIDRATOS NA HOMEOSTASE FISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE JUVENIS DE SURUBINS (<i>Pseudoplatystoma sp.</i>)</b> .....	<b>28</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 Adequações nas instalações .....	31
2.2 Aquisições dos peixes.....	32

2.3 Dietas experimentais .....	32
2.4 Realização do experimento .....	34
2.5 Desafio com lipopolissacarídeo (LPS) .....	35
2.6 Biometrias e coletas de amostras experimentais .....	35
2.6.1 Indicadores do Sistema Imune não específico .....	37
2.6.1.1 Atividade respiratória de leucócitos .....	37
2.6.1.2 Atividade de lisozima .....	37
2.6.1.3 Atividade hemolítica do complemento - via alternativa .....	38
2.6.2 Proteína total, albumina e globulina sérica .....	39
2.6.3 Parâmetros Hematológicos .....	39
2.7 Delineamento Experimental .....	41
2.8 Análise Estatística .....	41
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## **CAPÍTULO I**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado atual gira em torno de 158 milhões de toneladas, sendo o Brasil um dos poucos países com potencial para atender a demanda de produtos pesqueiros, oriundos do desenvolvimento da aquicultura. Entre os anos de 2003 e 2013, o consumo de pescado mundial aumentou 100%, gerando uma média de consumo de produtos de origem pesqueira por habitante ao ano de 14,5 quilogramas. A Organização Mundial da Saúde recomenda que o consumo de pescado ao ano deva ser em torno de 12 quilos por habitante. Esse crescimento elevado no consumo deve-se ao fato de que o pescado é um alimento muito saudável e tem ganhado cada vez mais a atenção da população, que busca melhorias na qualidade de vida. Não só como fonte de alimentação, o pescado têm se tornado uma fonte de renda importante, além de contribuir para a expansão da produção nacional e ganhar cada vez mais espaço no mercado (MPA, 2015).

Os grandes avanços no desenvolvimento da aquicultura ocorreram em meados do século XX, devido à exploração comercial e tecnológica de novas espécies de peixes, aprimorando a cadeia produtiva, principalmente nas questões nutricionais e sanitárias. Necessariamente, peixes devem consumir proteínas, minerais, vitaminas e uma fonte energética que garanta a manutenção de funções vitais como natação, respiração, reprodução, entre outros. Alguns nutrientes essenciais podem ser encontrados em ambientes onde há a presença de outros organismos aquáticos e alimentos naturais disponíveis. Por outro lado, se os peixes forem mantidos em sistemas de produção intensivos é necessária a utilização de uma dieta balanceada que possibilitará o melhor crescimento, desempenho e saúde do animal (WENDEMEYER, 1996).

Para determinar a concentração ótima de proteína nas rações para os peixes, deve-se levar em consideração a relação energia/proteína presente na dieta. A utilização da proteína da dieta ficará comprometida caso a relação energia/proteína esteja muito abaixo das necessidades da espécie, resultando em queda no crescimento. Em contrapartida, níveis muito elevados, causam queda no consumo prejudicando o desenvolvimento dos peixes. Por causa

disto, é de extrema importância que os níveis adequados de proteína sejam estabelecidos, da mesma maneira que as relações energia/proteína (BOSCOLO et al., 2011).

Os peixes carnívoros possuem o trato digestório curto comparado às espécies onívoras e herbívoras. Por conta desta característica adaptativa, exigem alimentos com elevados teores de proteína, pois o tempo de permanência do alimento neste trato é menor. Conhecer os hábitos alimentares da espécie que se pretende trabalhar, e sua relação com a anatomia do sistema digestório permite o desenvolvimento de rações adequadas, a fim de melhorar o desempenho do peixe aliado a menores custos de produção.

A energia, apesar de não ser considerada um nutriente, também é fundamental para a nutrição dos peixes, pois muitas funções (metabólicas, fisiológicas e bioquímicas) são realizadas a custo do suprimento e consumo de energia. Por isso, a utilização de níveis adequados de carboidratos não estruturais (amido) nas rações pode refletir na viabilidade econômica da atividade, além de ganho ambiental minimizando a excreção de amônia (PEZZATO et al., 2004).

O desenvolvimento de uma dieta nutricionalmente balanceada e que atenda as necessidades específicas da espécie produzida, proporciona adequado crescimento, estado sanitário e capacidade de resposta às condições adversas do ambiente. Um peixe criado com uma dieta deficiente em qualquer nutriente, seja ele essencial ou não, acarreta problemas negativos a saúde do animal, principalmente ao sistema imunológico (AZAZA et al., 2010).

À medida que a produção de qualquer espécie de peixe é intensificada, aumentam-se as chances de surtos epizooticos, podendo causar grandes perdas econômicas, especialmente devido a elevadas taxas de densidade populacional e práticas de manejo (transporte, reprodução, desinfecção, despesca, entre outros). Essas medidas criatórias impactam negativamente à saúde do peixe, pois ocasionam elevados níveis de estresse que refletem na homeostase do organismo, tornando-o mais susceptível a patógenos (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1999; SAKAI, 1999).

Uma vez que a infecção por estes patógenos se instala no organismo do peixe, muito tempo e trabalho são gastos na tentativa de eliminar o agente

patogênico e evitar que ele acometa o restante do lote (KUSUDA; KAWAI, 1998). A fim de evitar estes surtos epizooticos, a prevenção às doenças é uma alternativa ao uso de antibióticos, principalmente ao fato destes medicamentos causarem resistência bacteriana (MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009).

Nesse contexto, é ideal que se trabalhe de forma profilática, mantendo o sistema imunológico do animal saudável de modo que ele possa combater agentes patogênicos e proporcionar um ambiente livre do uso destes medicamentos (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Sistema imunológico dos peixes

O sistema imunológico nos peixes é formado de células e compostos humorais que vão atuar contra qualquer material estranho para defender o organismo. Esses materiais podem ser tanto micro-organismos, quanto células malignas ou toxinas que entrarão em contato com o corpo do animal, causando contaminação e dano interno e/ou externo (BAYNE; GERWICK, 2001).

Assim como todos os outros animais, os peixes também estão susceptíveis a qualquer tipo de invasão parasitária e infecções bacterianas, virais ou fúngicas. Quando o organismo do animal se depara com algum tipo de enfermidade, rapidamente é processada uma resposta de defesa denominada reação imunológica, ativando todos os mecanismos do sistema de defesa que irão atuar em conjunto tentando promover a proteção do organismo contra o agente causador da enfermidade, seja interna ou externamente (BALFRY; HIGGS, 2001). A resposta imune do organismo pode ser adquirida, desencadeando um processo específico induzido contra um agente externo através das imunoglobulinas, ou não específica, também conhecida como imunidade natural, acionando um mecanismo de defesa inato, atribuindo ao hospedeiro a capacidade de resistir a infecções (SAKAI, 1999; ANDERSON, 1974; SINDERMANN, 1990; SHEPHERD, 1992; DALMO; INGEBRIGTSEN; BODWALD, 1997; IWANA et al., 1997).

Para os mecanismos de resistência a doenças em peixes, o sistema imune inato é extremamente importante, principalmente porque para muitas espécies, a resposta imunológica adquirida é lenta (MAGNADÓTTIR, 2006). A fagocitose é o principal mecanismo de resposta celular não específica; ela antecede a produção específica de anticorpos e é mediada por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B e células “natural killer” (NK) – células fagocíticas. A lisozima e o sistema complemento pertencem à resposta humoral não específica (SAKAI, 1999).

A lisozima é uma enzima frequentemente localizada nas células epiteliais e nas secreções dos vertebrados. Tem alta atividade enzimática podendo causar lise celular através da quebra da ligação- $\beta$  do peptidoglicano

bacteriano (LOPERA et al., 2008). Sabe-se que a lisozima ataca principalmente bactérias Gram positivas, mas se atuar em conjunto ao sistema complemento, combate também algumas bactérias Gram negativas (ARUL, 2006).

Os macrófagos, por possuírem alta capacidade fagocítica, são outro exemplo de um importante mecanismo de defesa imune não específica. Eles combatem principalmente micro-organismos e podem ser dependentes de oxigênio (através de espécies reativas de oxigênio {EROs} ou espécies reativas de nitrogênio {ERN}) ou independentes. Os macrófagos combatem patógenos, e modulam o sistema imune inato, além de estimular outros leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) e assim eliminar o patógeno do organismo (SAKAI, 1999).

Durante a fagocitose, ocorre a redução do oxigênio em superóxido através de uma enzima chamada superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este mecanismo é conhecido como burst oxidativo causando um aumento significativo no consumo de oxigênio molecular (BASHEERA et al., 2002). Para determinar as espécies reativas de oxigênio consumidas pelo burst faz-se um ensaio colorimétrico onde o corante nitroblue tetrazolium (NBT) é reduzido formando precipitados insolúveis no interior do fagócito, chamados de grânulos de formazan (KLEIN, 1990).

O muco e as imunoglobulinas constituem a primeira barreira de proteção da pele contra patógenos, atuando juntamente com as lectinas, proteases e lisozima. A barreira mecânica contra o invasor presente nos peixes é representada pelas escamas e células queratinizadas; se por algum fator o peixe acabar perdendo algumas escamas ou a mesma for ausente (no caso dos peixes de couro), rapidamente ocorre uma produção excedente de muco. Se ainda assim o patógeno conseguir atingir o sangue ou os tecidos do hospedeiro, um sistema de defesa mais complexo é ativado causando lise ou opsonização do patógeno para que possa ser fagocitado por leucócitos (ALEXANDER; INGRAM, 1992).

O sistema de defesa dos peixes é influenciado por fatores externos como qualidade da água, temperatura e estresse. O tempo gasto para iniciar uma resposta imune específica, por exemplo, pode variar de 7 a 14 dias, enquanto que nas aves e mamíferos ocorre em 48 horas, justificando a variabilidade do mecanismo humoral de defesa, influenciado por tais fatores

externos. Por outro lado, os mamíferos possuem anticorpos diferentes e mais eficientes quando comparados aos peixes, e por este fator o estudo da resposta imune nos peixes é uma tarefa árdua. Além de todos os fatores externos influenciando a resposta imunológica no organismo dos peixes, ainda há variabilidade individual, variabilidade genética, alterações ambientais drásticas, estado nutricional e alimentar do peixe, condições de estresse em que aquele animal está sendo submetido e tipo de patógeno presente no meio interferem na forma de resposta nos peixes (SHOEMAKER; KLESIUS; LIM, 2001).

### **2.1.1 Imunidade humoral**

O sistema imunológico nos peixes é constituído de elementos inatos e adquiridos, humorais e mediados por células responsáveis por defender o organismo do animal contra qualquer agente invasor evitando diversas formas a instalação de doenças (ELLIS, 2001).

As bactérias são as maiores causadoras de doenças por todo o mundo, inclusive nos peixes. Para resistir a estas invasões, os peixes dispõem de mecanismos inatos e específicos, humorais e celulares que são responsáveis por produzir uma série de compostos antibacterianos (ELLIS, 2001).

Compõem os elementos humorais inatos o que chamamos de inibidores do crescimento das bactérias: as antiproteases, lisozima, proteínas do sistema complemento (ativada pela via alternativa e da lectina). Estes inibidores serão responsáveis por influenciar e potencializar a ação das células de defesa do organismo no hospedeiro. Para que uma bactéria consiga instalar a infecção no organismo é necessário que ela supere algumas respostas de defesa desencadeadas imediatamente à presença do patógeno, como os fagócitos (células de defesa representadas por neutrófilos e macrófagos, responsáveis por fagocitar o invasor) e a produção de EROs (que são responsáveis diretos pela destruição bacteriana). Essas respostas que inibem o crescimento bacteriano são importantes para evitar que qualquer colônia se dissemine por órgãos e tecidos causando danos mais graves ao organismo do animal.

A lisozima é produzida durante infecções bacteriológicas, e possui capacidade de promover a lise da parede celular das bactérias Gram-positivas através da quebra nas ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas entre os ácidos N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamínico (PAULSEN et al, 2003). É uma enzima presente no muco, nos ovos e em alguns tecidos, e quando age em conjunto com as proteínas do sistema complemento, é capaz também de causar lise na parede celular de bactérias Gram-negativas (VERLHAC; GABAUDAN, 1997; PAULSEN et al., 2001).

O sistema complemento abrange aproximadamente um grupo composto por 35 proteínas envolvidas nas respostas imunes inespecíficas e específicas. Este sistema pode ser ativado por três vias distintas: a via alternativa (ativada pela superfície do patógeno); a via da lectina (um complexo proteico de lectina se liga à manose) e a via clássica (que constitui um mecanismo de resposta específica antígeno – anticorpo) (HOLLAND; LAMBRIS, 2002).

### **2.1.2 Imunidade celular**

Além da imunidade humoral, os peixes também apresentam um sistema de defesa celular. Estas células são produzidas nos tecidos linfóides e possuem capacidades de auto renovação; elas maturam e se proliferam diferenciando-se em outras células de acordo com o estímulo que lhes é dada. Podem se diferenciar em eritrócitos, granulócitos, monócitos, mastócitos, linfócitos e trombócitos. A este processo damos o nome de hematopoiese (METCALF, 1995; EVANS, 1997). A formação de todas essas células é necessária, pois são elas que vão atuar no sistema de defesa não específica na eliminação dos patógenos intracelulares nos peixes (SECOMBES, 1996).

#### **2.1.2.1 Linfócitos**

Nos peixes, os linfócitos possuem funções e características semelhantes à de vertebrados superiores (CLEM et al., 1991). Apesar de circularem por todo corpo pela corrente sanguínea, ficam mais concentrados nos órgãos linfóides (PELETEIRO; RICHARDS, 1985; HIBIYA, 1994). São responsáveis pela produção de anticorpos e promovem a liberação de reguladores imunes

(YOSHINAGA et al., 1994). Dividem-se em linfócitos B e T; os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos participando da resposta imune específica humoral. Os linfócitos T desempenham funções específicas (TIZARD, 2002):

<b>Linfócitos T auxiliares:</b> distinguem antígenos específicos desencadeando mensageiros químicos que estimulam a atividade celular, como os fagócitos, linfócitos B e outros linfócitos T.
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Linfócitos T citotóxicos:</b> migram para o local da infecção e liberam substâncias tóxicas que destroem as células estranhas
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Linfócitos T supressores:</b> contêm a resposta imune quando a infecção já está controlada.
------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Linfócitos T memória:</b> são células inativas que em contato com o mesmo antígeno que causou a infecção anterior, se ativam
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

A concentração de linfócitos nos peixes ainda é bastante variada, pois recebe influência de diversos fatores como sua espécie, as condições de coleta, armazenamento e processamento do sangue e variações ambientais (FERNANDEZ et al., 2002).

### 2.1.2.2 Neutrófilos

Os neutrófilos são as células primárias que combatem os processos iniciais de inflamação nos peixes (MANNING, 1994). São células polimorfonucleadas que podem estar isolados no sangue, tecidos linfóides e cavidade peritoneal (SECOMBES, 1996). Mediante a infecção bacteriana, são os neutrófilos que aparecerão em maior número na corrente sanguínea, pois possuem altos poderes fagocíticos (SUZUKI, 1984). Outra importante função dos neutrófilos é a capacidade de converter oxigênio em compostos metabólitos que derivam do oxigênio, como os radicais livres (PLYZYCZ et al., 1989).

### 2.1.2.3 Basófilos e Eosinófilos

Nos peixes, os basófilos estão ausentes na maioria das espécies. A maioria dos eosinófilos encontra-se no trato gastrointestinal e nas brânquias. Sua função nos peixes ainda não é totalmente conhecida, mas sabe-se que eles influenciam nos processos de inflamação (HINE, 1992).

#### **2.1.2.4 Monócitos e Macrófagos**

Estas células, nos peixes, são responsáveis pela produção de citocinas e por apresentar os antígenos aos anticorpos para serem combatidos. Estas células são as mais importantes do sistema de defesa dos teleósteos. As células que fazem parte do processo de fagocitose e na destruição de patógenos estão isoladas no sangue, na cavidade peritoneal ou nos órgãos linfoides, e são responsáveis por interligar os dois sistemas de defesa, específico e inespecífico (VALLEJO et al., 1992; SHOEMAKER et al., 1997

#### **2.1.2.5 Células Citotóxicas**

As células citotóxicas são conhecidas como "*natural killer*" ou NK. Sua função principal é promover a lise das células estranhas ao organismo, ou que apresentem qualquer antígeno que ative o sistema imune. As células citotóxicas respondem ao sistema imune não específico, pois não há reconhecimento de epítomos nem formação de células específicas que ativem qualquer resposta imunológica. Alguns fatores podem determinar a distribuição destas células no organismo do peixe, a dieta, a temperatura da água e o estresse são os principais deles (LEMORVAN-ROCHER et al., 1995).

## 2.2. Lipopolissacarídeo (LPS)

Os lipopolissacarídeos (LPS), componentes estruturais da parede celular de bactérias Gram negativas, são também endotoxinas. Algumas espécies de peixes evidenciaram a resistência a este tipo de substância, que apresenta em sua composição uma porção antigênica específica, e outra porção não específica denominada lipídeo A, servindo estas porções para reconhecimento imune (BERTÓK, 1998).

A porção do lipídeo A do LPS é responsável pela toxidez das endotoxinas quando entram em contato com o organismo do animal, mesmo em doses muito pequenas, abaixo de um nanograma (BERTÓK, 1998).

Quando inoculado no organismo do animal, o LPS se junta a uma proteína plasmática sintetizada no fígado conhecida como LBP. Esta interação é capaz de aumentar ação do LPS entre 100 e 1000 vezes. O novo complexo formado LBP/LPS vai se unir a receptores específicos denominados CD14 na superfície dos monócitos e macrófagos (BERTÓK, 1998).

Em peixes, o contato com o LPS não causa distúrbios na coagulação sanguínea nem leva o animal a óbito (CONGLETON et al., 1991 e ROBERTSEN, 1999), como pode acontecer com alguns mamíferos. Em um estudo realizado com a truta e o salmão, observaram que a inoculação de LPS em doses de 5 a 10 mg/kg elevou os níveis de cortisol sérico e acelerou a glicogenólise, induzindo o organismo a modificações metabólicas (HINE e WAIN, 1988).

ENDO et al. (1997) compararam duas vias de inoculação de LPS em tilápias do Nilo e observaram que quando inoculadas na bexiga natatória, houve a formação do que pode ser chamado de exsudato, um líquido com alto teor de proteínas séricas e leucócitos que é produzido em resposta a qualquer dano nos tecidos e vasos sanguíneos, 24 horas após a inoculação. Bem como, CONGLETON et al. (1991) observaram uma diminuição na concentração de ferro plasmático em truta, indicando que houve liberação de lactoferrina das granulações de neutrófilos, responsável por impossibilitar que as bactérias usem o ferro para seu desenvolvimento dentro do organismo, processo desencadeado pelo organismo como mecanismo de defesa.

O tempo para que essas modificações se expressem pode variar muito de acordo com a fonte que o LPS em estudo foi extraído, qual o método de isolamento e principalmente a via de inoculação (WHITE et al., 1984). Por isso, ressalta-se a importância de maiores estudos sobre as respostas metabólicas, fisiológicas e imunológicas dos peixes submetidos ao desafio com LPS.

### 2.3 A Imunidade e a nutrição dos peixes.

Muitos pesquisadores tem voltado sua atenção para a relação direta entre dieta e imunidade na busca pela melhoria da saúde do peixe. Entender a influência que a alimentação exerce no desenvolvimento de doenças é de suma importância para diminuir eficientemente os efeitos danosos dos patógenos e proporcionar condições de recuperação e resposta dos animais, evitando inclusive o uso de medicamentos (LI, WANG; GATLIN 2006).

A alimentação apropriada é importante para promover o crescimento saudável dos peixes, e suprir os nutrientes essenciais necessários para o funcionamento normal do organismo, para que, quando expostos a qualquer componente que afete diretamente sua saúde, sejam capazes de combatê-lo sem o uso de medicamentos. Qualquer que seja o nutriente deficiente no organismo do peixe causará alterações na homeostase metabólica no organismo do animal, e pode torná-lo mais suscetível a agentes patogênicos. Por isso, a formulação das dietas artificiais utilizadas nos sistemas produtivos da aquicultura deve ser feita de forma criteriosa para suprir adequadamente os nutrientes específicos de cada espécie, necessários para a manutenção da saúde do peixe (GATLIN III, 2002).

Assim, o fornecimento de uma dieta adequada irá interferir tanto no sistema de defesa inato, quanto na resposta dos anticorpos; possivelmente evitando a susceptibilidade do animal às doenças infecciosas que estão diretamente relacionadas à má nutrição (ALCORN et al., 2003).

A alimentação tem influência direta no sistema imune dos peixes, bem como no sistema endócrino, uma vez que estes sistemas interagem entre si. O hormônio do crescimento, por exemplo, tem competência de agir na conservação de alguns processos fisiológicos em salmonídeos, podendo cooperar para a resistência do organismo mediante uma infecção bacteriana (SAKAI et al., 1999).

Quaisquer que sejam as variações nas práticas alimentares dos peixes dentro de uma piscicultura influenciarão diretamente na capacidade de combater às doenças, podendo estimular ou não o sistema imune e/ou retardar ou acelerar a disseminação do patógeno dentro da população aquática (GATLIN III, 2002). Nos sistemas de produção de *Ictalurus punctatus*,

popularmente conhecido como bagre do canal, é comum suspender a alimentação a partir do momento que qualquer tipo de infecção bacteriana acomete os peixes, conseguindo os criadores diminuir a mortalidade do lote (SALAS-LEITON et al., 2010).

Outra influência que a alimentação exerce sobre a resposta imune nos peixes é na capacidade de resistência às infecções. Muitos processos celulares, como a fagocitose, se tornam inversamente proporcionais à taxa de alimentação. Restringir alimento aos peixes afeta de forma drástica e negativa a concentração dos leucócitos sanguíneos e na capacidade hemolítica dos anticorpos (ALCORN et al., 2003).

Assim como a falta de nutrientes afeta a imunidade do peixe, o excesso de macro e micronutrientes nas dietas também pode causar prejuízos à saúde do animal e predispor-lo a infecções como, por exemplo, o excesso de ferro na dieta pode potencializar a capacidade de virulência dos micro-organismos invasores (WEINBERG, 1989).

Pesquisas que tenham como foco a interação entre alimentação adequada e imunidade tem ganhado cada vez mais espaço na comunidade acadêmica e incentivo de instituições financiadoras de projetos, pois é uma eficiente alternativa ao uso dos antibióticos, além de contribuírem para um melhor desempenho do animal nos sistemas intensivos de produção.

## 2.4 Peixes e o metabolismo energético

As fontes energéticas não protéicas utilizadas pelo metabolismo dos peixes são os carboidratos e lipídeos. Após serem convertidos em acetil-CoA, são oxidados no ciclo de Krebs gerando energia e produzindo CO<sub>2</sub>. Um problema enfrentado na produção excessiva de energia é a inibição de algumas enzimas responsáveis pela produção de ATP e CO<sub>2</sub>. O excesso de energia, por outro lado, favorece a atividade enzimática para formar moléculas energéticas, que servirão de reserva ao organismo, como os triglicerídeos e o glicogênio. Entretanto quando não há lipídeos e carboidratos como fonte energética, os peixes acabam por utilizar a proteína como fonte alternativa de energia (CASERAS et al., 2000; HEMRE et al., 2002).

Esses parâmetros encontrados dentro da normalidade podem indicar que a quantidade energética da dieta não excedeu a demanda do animal a ponto de ocasionar a síntese e o acúmulo de triglicerídeos. Caracteriza também que o fornecimento de energia foi suficiente, evitando que o organismo utilize proteínas como fonte energética, enfatizando ainda mais a preocupação com a quantidade e a qualidade de inclusão dos lipídeos e carboidratos na dieta e suas influências na nutrição dos peixes (WANG et al, 2005; ZHONG et al., 2007).

Peixes carnívoros utilizam mais eficientemente os lipídios como fonte energética, pois possuem capacidade limitada em controlar a glicemia através de seu metabolismo (CASERAS et al., 2002; HEMRE et al., 2002). Os lipídios são muito importantes nutricionalmente para os peixes carnívoros. Em um estudo realizado por Martino, Cyrino e Portz (2002), os autores avaliaram rações contendo de 6 a 18% de óleo de soja e verificaram um aumento proporcional no desempenho dos peixes. Da mesma forma, Martino, Cyrino e Portz (2005) comprovaram que rações que continham de 19 a 27% de lipídios para o pintado (*P. corruscans*) não comprometeram o desempenho. Altos níveis de gordura na ração pode não ser eficiente para poupar a oxidação de proteínas, ocasionando maior deposição de gordura; além de comprometer o processamento e a estabilidade da dieta.

Os carboidratos são utilizados eficientemente por algumas espécies de peixes onívoras, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui

(*Colossoma macropomum*), entre outras, sem causar prejuízos ao desempenho e à saúde mesmo em altas inclusões nas rações (LOCHMANN e CHEM, 2009). Fato este de grande importância, pois resulta para a piscicultura maior sustentabilidade, deixando de lado a necessidade da utilização de alimentos de origem animal (como por exemplo farinha e o óleo de peixe). Para as espécies carnívoras, foi constatado que o pintado (*P. corruscans*), possui capacidade de receber rações com níveis de inclusão de carboidratos próximos a 20% (MARTINO; CYRINO; PORTZ, 2005).

Apesar de lipídios e carboidratos terem grande importância na formulação de rações para peixes em cativeiro, a proteína assume grande importância na composição das dietas uma vez que é exigida em quantidades elevadas, principalmente para os carnívoros (NAVARRO; MATTA; LANNA, 2006). O nível proteico de uma ração para carnívoro pode variar entre 40 a 55% (ALVARES-GONZÁLES; CIVERA-CEVEREDO; ORTIZGALINDO 2001).

Entre esses três nutrientes, os carboidratos são os que apresentam maior viabilidade econômica por serem ingredientes mais acessíveis e de custo baixo, uma vez que a ração é responsável por 70% dos gastos na produção, e sua inclusão em dietas para carnívoros pode ser uma alternativa.

Entretanto, níveis elevados de carboidratos nas dietas podem causar impactos negativos à saúde dos peixes através de distúrbios metabólicos, tais como hiperglicemia, aumento da deposição de glicogênio, hipertrofia hepática, entre outros. Uma vez que a maioria dos peixes carnívoros apresenta dificuldade para recuperar a homeostasia glicêmica do organismo, o que caracteriza uma intolerância à glicose (HEMRE et al., 2002; RAWLES; GATLIN, 1998; RAWLES et al., 2008; AZAZA et al., 2010; MENSI et al., 2009).

Uma ferramenta favorável na avaliação do bem-estar e da saúde dos peixes é analisar as características bioquímicas, imunológicas e hematológicas assim como a resposta metabólica e fisiológica do peixe posteriormente ao fornecimento de uma dieta rica em carboidratos, a fim de averiguar quais benefícios e malefícios aquela dieta trouxe ao organismo do animal, a fim de contribuir para que as formulações se tornem mais precisas e atendam as demandas dos animais nos sistemas de produção (AZAZA et al., 2010; LIU et al., 2012).

## 2.5 Digestão e absorção de carboidratos em peixes

Dentre os nutrientes da dieta que passarão por digestão, os carboidratos geram uma série de controvérsias na alimentação dos peixes, pois a deficiência destes nutrientes na dieta não é manifestada pelo animal, exceto por algumas espécies que tem seu crescimento alterado quando alimentados com dietas isentas de CHO. A faixa de inclusão de carboidratos nas dietas para peixes é variada, de 7 a 40%, sendo determinada de acordo com o hábito alimentar específico de cada espécie; por exemplo, herbívoros toleram níveis de amido próximos a 40% enquanto que carnívoros toleram aproximadamente 10% (FURUYA, 2007).

O fornecimento de dietas com níveis mais elevados de carboidratos (amido) exige uma série de cuidados principalmente pelo fato de que estão associados com o aumento no tamanho e no peso do fígado, podendo causar alterações hepáticas em algumas espécies como a truta arco-íris, o salmão de atlântico e o pintado (FURUYA, 2007).

A utilização de carboidratos como fonte energética para carnívoros levanta uma série de questões a serem estudadas uma vez que estes peixes possuem baixa capacidade para utilizar este ingrediente. . Como forma de melhorar a digestibilidade desta fonte, a modificação térmica tem sido uma alternativa para melhorar o aproveitamento do carboidrato da dieta na forma de energia. Os amidos cozidos ou gelatinizados tem um efeito maior sobre o crescimento dos peixes comparados a sua forma crua. Durante a gelatinização dos grãos de amido, as moléculas de carboidratos são modificadas de modo a aumentar a ação enzimática. Conseqüentemente, há uma melhora na digestibilidade do carboidrato, e esta influência do processamento têm sido estudada em espécies como a capa comum (*Cyprinus carpio*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FORNEIRS et al., 1993; BERGOT; BERQUE 1983; PODOSKINA et al., 1997; TOLEDO, 2004).

Os carboidratos em peixes inicialmente são quebrados pelas carboidrases ( $\alpha$ -amilase), enzimas responsáveis pela quebra de carboidratos estruturalmente mais complexos. Após catalisar estas moléculas, inicia-se a ação das oligossacaridasas e dissacaridasas que formarão os

monossacarídeos possíveis de serem absorvidos pelos enterócitos. A concentração disponível de amido na dieta está diretamente relacionada com a quantidade enzimática no trato digestório dos peixes. Se os índices de glicemia e dextrina residual estiverem elevados, mostra que a dieta contém elevados níveis de amilopectina, a porção mais ramificada do amido, ou seja, evidencia que há uma maior atividade da  $\alpha$ -amilase, maltase e sacarase tornando disponíveis maiores concentrações de monossacarídeos que servirão de substrato energético (RAWLES e LOCHMANN, 2003).

Para as espécies carnívoras, geralmente esta capacidade de adaptação é limitada (PAPOUTSOGLU; LYNDON, 2006). Porém, o pintado (*P. corruscans*) demonstrou ser uma das poucas espécies carnívoras capaz de potencializar a atividade das carboidrases no trato digestório quando alimentado com dietas que contenham níveis elevados de carboidratos, disponibilizando altas concentrações de monossacarídeos absorvíveis (LUNDSTEDT et al., 2004).

Para a absorção destes monossacarídeos nos peixes, o processo é semelhante ao que ocorre nos mamíferos. É necessário que a glicose passe da luz intestinal para o citosol, e em seguida do citosol para a corrente sanguínea. A glicose não tem a capacidade de atravessar os poros da membrana celular, devido seu alto peso molecular, e para tal conta com transportadores específicos de membrana (FERRARIS, 2007). A absorção da glicose vai variar muito de acordo com a eficiência dos transportadores e sua localização por todo trato intestinal, quanto mais próximo à região proximal do intestino, maior é a capacidade de absorção de monossacarídeos (AHEAM et al., 1992).

O cuidado que se deve tomar ao incluir níveis elevados de carboidratos nas dietas, é que isto pode causar impactos negativos à saúde dos peixes através de distúrbios metabólicos, tais como hiperglicemia, esteatose hepática, hipertrofia hepática, entre outros (HEMRE et al., 2002; RAWLES; GATLIN 1998; RAWLES et al., 2008; AZAZA et al., 2010; AZAZA et al., 2009).

## 2.6 Modelo biológico - *Pseudoplatystoma sp.*

O híbrido surubim *Pseudoplatystoma sp.*, pertence à ordem dos Siluriformes, família Pimelodidae e gênero *Pseudoplatystoma* (TAVARES-DIAS et al., 1999). São peixes de couro que possuem corpo arredondado e alongado, cabeça achatada e três pares de barbilhões próximos à boca (Figura 1) (TAVARES-DIAS et al., 1988). São espécies icitiófagas nativas da bacia do Paraná, São Francisco e Amazônia (TAVARES-DIAS et al., 2007; CAMPOS, 2010). Este gênero possui um elevado potencial produtivo para a piscicultura nacional, pois sua carne é nobre, proporcionando um filé de qualidade com pequena quantidade de espinhas. Além da produção destinada à mesa, o surubim também é cultivado para a pesca esportiva e como peixe ornamental (CAMPOS, 2010).

Existem oito diferentes espécies de surubins, destacando-se o surubim pintado (*P. corruscans*) e o surubim cachara (*P. reticulatum*) por serem de alto interesse produtivo e comercial. São espécies muito parecidas diferindo uma da outra apenas pela característica das machas negras padrões presentes por todo o corpo acinzentado. Apesar de ser uma espécie apreciada tanto por produtores quanto por consumidores, algumas particularidades da espécie podem ser inconvenientes. O híbrido surubim (*Pseudoplatystoma sp.*) também possui hábito alimentar carnívoro e noturno, e sua produção intensiva exige treinamento alimentar aprimorado e teores proteicos nas dietas mais elevados (BUITRAGO-SUÁREZ e BURR, 2007).

Apesar destas particularidades, tanto o pintado quanto o cachara possuem um sistema digestório característicos de carnívoros, mas os órgãos apresentam particularidades que permitam flexibilidade na dieta, comum apenas para siluriformes onívoros (SEIXAS FILHO et al., 2001; RODRIGUES et al, 2009).

Trabalhos sobre as exigências nutricionais e seus efeitos sobre a resposta imunológica em surubim (*Pseudoplatystoma sp.*) ainda são escassos. A variabilidade individual dos peixes nas respostas fisiológicas a agentes patogênicos torna a tarefa de estudar e avaliar as respostas imunológicas destes animais necessária e proveitosa para o desenvolvimento de pesquisas

aprofundadas, a fim de melhorar o cultivo das espécies nos sistemas de criação sem prejuízos aos peixes e aos produtores.



Figura 1: Representação do surubim híbrido (*Pseudoplatystoma sp.*).

Fonte: arquivo pessoal

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J. B.; INGRAM, G. A. Noncellular non-specific defense mechanisms of fish. **Annual Revision of Fish Disease**, v. 2, p. 249–279. 1992.

ALVARES-GONZÁLES, C.A.; CIVERA-CEVEREDO, R.; ORTIZGALINDO, J.L. et al. Effect of protein level on growth body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. **Aquaculture**, v.194, p.151-159, 2001.

ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.) **Diseases in Asian Aquaculture II**. Manila: Fish Health Section/Asian Fisheries Society, p. 185-202. 1995.

AZAZA, M. S.; DHRAIEF, M. N.; KRAIEM, M. M.; BARAS, E. Influences of food particle size on growth, size heterogeneity, feed efficiency and gastric evacuation of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758. **Aquaculture**, v.309, p. 193–202, 2010.

AZAZA, M. S.; MENSI, F.; WASSIM, K.; ABDELMOULEH, A.; BRINI, B.; KRAÏEM, M. M. Nutritional evaluation of waste date fruit as partial substitute for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, p. 262–272, 2009.

BALFRY, S. K.; HIGGS, D. A. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Haworth Press, 2001. p. 213-225.

BASHEERA JOHN, M.; CHANDRAN, M. R.; ARUNA, B. V.; ANBARASU, K. Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunised with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, p. 201-207, 2002.

BAYNE, C. J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 725-743, 2001.

BERGOT, F.; BREQUE, J. (1983). Digestibility of starch by rainbow trout: Effects of the physical state of starch and of the intake level. **Aquaculture**, 34, 203-212.

BERTOK, L. Endotoxins and endocrine system. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 305-308, 1998.

BUITRAGO-SUÁREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystomableeker* (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p. 1-38, 2007.

CAMPOS, J. L. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystomacorruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystomae* seus híbridos. In. BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Orgs.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2010. p. 335-361.

CASERAS, A.; METÓN, I.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Glucokinase gene expression in nutritionally regulates in liver of gilthead sea bream (*Sparusaurata*). **BiochimicaetBiophysicaActa (BBA) – Gene Structure and Expression**, v. 1493, n 1-2, p. 135-141, 2000.

CLEM, L. W.; MILLER, N. W.; BLY, J. E. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. In: WARR, G.W.; COHEN, N. (Ed.). **Phylogenesis of Immune Functions**, Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 191-213.

CONGLETON, J.; WAGNER, E. Acute-phase hypoferremic response to lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 98A, n. 2, p. 195-200, 1991.

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

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

- ENDO, M.; ARUNLERTAE, C.; RUANGPAN, L. A new method for collecting neutrophils using swim bladder. **Fisheries Sciences**, v. 63, n. 4, p. 644-645, 1997.
- EVANS, T. Developmental biology of hematopoiesis. **Hematology and Oncology of Clinic North America**, v.11, n.6, p.1115-1147, 1997.
- FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleosteos (I): Células y órganos. **Revista AquaTIC**, v. 16, 2002.
- FERRARIS, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (*Osteichthyes: Siluriformes*), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 628, 2007.
- FORNERIS, G.; BOCCIGNONE, M.; PALMEGIANO, G. B.; QUAGLINO, G., ROAGNA, L.. Digestibility of maize and rice in carp (*C. carpio*) feed processed with starch gelation. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.8, n.1-8, 1993.
- FURUYA, W. M. Redução do impacto ambiental por meio da ração. In: III SEMINÁRIO DE AQUICULTURA, MARICULTURA E PESCA, 3., 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: [s.n.], 2007.
- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, v. 255, p. 179-187. 2006.
- HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, v. 317, n.1, p. 1-15, 2011.
- HEMRE, G. I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175-194, 2002.
- HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Stuttgart: Gustav Fish Verlag., 1994. p. 5-125.

- HINE, P.; WAIN, J. Characterization of inflammatory neutrophils induced by bacterial endotoxin in the blood of eels, *Anguilla australis*. **Journal of Fish Biology**, v. 32, p. 579-592, 1988.
- HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 2, p. 79-88, 1992.
- HOLLAND, M. C.H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, n. 5, p. 399–420, 2002.
- KLEIN, J. Defence reactions mediated by phagocytes. In: \_\_\_\_\_. **Immunology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications Inc., 1990. p. 311-334.
- LEMORVAN-ROCHER, C.; TROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Effect of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic activity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 19, p. 87-95, 1995.
- LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D. M. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, v. 251, p. 201–209. 2006.
- LIM, C.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H. The effect of ascorbic acid on the immune response in fish. In: DABROWSKI, K. (Ed.). **Ascorbic Acid in Aquatic Organisms**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.149-166.
- LOCHMANN, R.; CHEN, R. Effects of carbohydrate-rich alternative feedstuffs on growth, survival, body composition, hematology and nonspecific immune response of black pacu, *Colossoma macropomum*, and red pacu, *Piaractus brachipomus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.40, n.1, p.33-44, 2009.
- LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystomacorruscans*(Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 137, p. 331–339, 2004.

- MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137-151, 2006.
- MANNING, M.J. Fishes. In: TURNER (Ed.), **Immunology**. Chichester: John Wiley and Sons, p. 69-100, 1994.
- MARTINO, R.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; TRUGO, L. C. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystomacorruscan* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, v.11, n.2, p.131-137, 2005.
- MARTINO, R.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L. et al. Effect of dietary lipid on nutritional performance of the surubim, *Pseudoplatystomacorruscans*. **Aquaculture**, v.209, p.209- 218, 2002.
- METCALF, D.; NICOLA, N. A. **The hematopoietic colony-stimulating factors: From biological to clinical applications**. New York: Cambridge University Press. 1995.
- MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano de desenvolvimento da aquicultura**, 2015. Disponível em: <[www.mpa.gov.br](http://www.mpa.gov.br)>. Acesso em: 01 out. 2015.
- MURRAY, A.; PASCHO, R. J.; ALCORN, S. W.; FAIRGRIEVE, W. T.; SHEARE, K. D.; ROLEY, D. Effects of various feed supplements containing fish protein hydrolysate or fish processing by-products on the innate immune functions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v. 220, p. 643-653, 2003.
- NAVARRO, R.D.; MATTA, S.L.P.; LANNA, E.A.T.; DONZELE, J. L.; RODRIGUES, S. S.; SILVA, R. F.; CALADO, L. L.; RIBEIRO FILHO, O. P.; Níveis de energia digestível na dieta do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) no desenvolvimento testicular em estágio pós-larval. **Zootecnia Tropical**, v.24, n.2, p.153-163, 2006.
- PAPOUTSOGLOU, E. S.; LYNDON, A. R. Digestive enzymes along the alimentary tract of the parrotfish *Sparisomacretense*. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 1, p. 130-140, 2006.

PAULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmosalar*) macrophages treated with yeast glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 23-37, 2001.

PAULSEN, S. M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. In vivo effects of Bglucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmosalar*L.).**Fish Shell fish Immunology**, v. 14, p. 39- 54. 2003.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Paraná: EDUEM, Nupélia, 1999. 264p.

PELETEIRO, M. C.; RICHARDS, R. H. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmogairdneri* Richardson. **Journal of Fish Disease**, v. 8, p. 161-172, 1985.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P.; Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p, 75-170.

PLYZYCZ, B.; FLORY, C. M.; GALVAN, I.; BAYNE, C. J. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 13, p. 217-224. 1989.

PODOSKINA, T. A., PODOSKIN, A. G., BEKINA, E. N. Efficiency of utilization of some starch modifications by rainbow trout (*O. mykiss*). **Aquaculture**, 152, 235–248, 1997.

RAWLES, S. D.; GATLIN, D. M. Carbohydrate utilization in striped bass (*Moronesaxatilis*) and sunshine bass (*M. Chrysops* [female] x *M. saxatilis* [male]). **Aquaculture**, v. 161, n. 1-4, p. 201-212, 1998.

RAWLES, S. D.; THOMPSON, K. R.; BRADY, Y. J.; METTS, L. S.; GANNAM, A. L.; TWIBELL, R. G.; WEBSTER, C. D. A comparison of two faecal collection methods for protein and amino acid digestibility coefficients of menhaden fish meal and two grades of poultry by-product meals for market-size sunshine bass

(*Moronechrysops x M. saxatilis*). **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 81-90, 2008.

ROBERTSEN, B. Modulation of the non specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish Shellfish Immunology**, v.9, p. 269-290, 1999.

RODRIGUES, A. P. O.; PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; CYRINO, J. E. P.; DELGADO, E. F.; MACHADO-NETO, R. Intestinal morphology and histology of the striped catfish *Pseudoplatystomafascinatum* (Linnaeus, 1766) fed dry diets. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, p. 559-563, 2009.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, Issues 1-2, p. 63–92, 1999.

SECOMBES, C. J. The Nonspecific Immune System: celular defensas. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p. 63-105.

SEIXAS FILHO, J. T.; BRÁS, J. M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. Anatomia funcional e morfologia do intestino no Teleostei (Pisces) de agua doce Surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* - Agassiz, 1829). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1670-1680, 2001.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; PLUMB, J. A. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 58, p. 181-190, 1997.

SUZUKI, K. A light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rochfish and rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, v. 50, p. 1305-1315, 1984.

TAVARES DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLO, L. D.; MORAES, G.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae)

em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 2, p. 431-431, 1999

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**: uma introdução. São Paulo: Roca, 2002. 532p.

Toledo, M. P. **Processamentos de dietas práticas com diferentes fontes de energia para o crescimento e a digestibilidade da tilápia do Nilo**. 2004. Xx f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, , 2004.

VALLEJO, A. N.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. In: FAISAL, M., HETRICK, F.M. (Ed.), **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 73-89, 1992.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on Fish Health**. Basel: Hoffmann-La Roche,, 1997. 30 p. (Roche Technical Bulletin)

WANG, Y.; LIU, Y. J.; TIAN, L. X.; DU, Z. Y.; WANG, J. T.; WANG, S.; XIAO, W. P. Effects of dietary carbohydrate level on growth and body composition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 14, p. 1408-1413, 2005.

WENDEMEYER, G. **Physiology of fish in intensive culture system**. New York: Chapman e Hall, 1996. 300p.

WHITE, A.; McARTHUR, J.; FLETCHER, T. Distribution of endotoxin and its effect on serum concentration of C reactive protein and cortisol in the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.79C, p. 97-101, 1984.

## **CAPÍTULO II**

### **INFLUÊNCIA DE CARBOIDRATOS NA HOMEOSTASE FISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE JUVENIS DE SURUBINS (*Pseudoplatystoma* sp.)**

## 1 INTRODUÇÃO

O surubim híbrido é considerado um dos melhores e mais valiosos peixes para a piscicultura devido a sua rusticidade, excelente taxa de crescimento e índices de rendimento de filé e carcaça (BURKERT et al., 2008; ROUBACH et al., 2003). Devido as qualidades zootécnicas e organolépticas do surubim, a criação em cativeiro avançou significativamente nos últimos anos, cerca de 8,75 toneladas de pescado entre os anos de 2008 a 2010 (MPA, 2011) e proporcional a este crescimento, o aparecimento de doenças e infecções bacterianas surgiram nestes sistemas comprometendo a cadeia produtiva. Estes surtos epizoóticos se dão devido às praticas rotineiras dentro de uma piscicultura, como manejo, transporte, adensamento e mudança na dieta. Estas práticas causam alterações no equilíbrio homeostático destes animais, afetando diretamente processos dependentes de energia como reprodução, crescimento e resistência a doenças (WENDEMEYER, 1996).

Avaliar os alimentos é fundamental para estudar nutrição, formulação de dietas e sua influência sobre o desempenho zootécnico de qualquer espécie animal (GONÇALVEZ; CARNEIRO, 2003). Especificamente para os peixes carnívoros, a fração protéica tem grande importância em razão da disponibilidade de alimentos na natureza. No entanto, a inclusão de carboidratos não estruturais na formulação da dieta, como o amido pré-gelatinizado, pode apresentar ganho econômico e ambiental, minimizar a excreção de amônia e causar um efeito poupador de proteína, disponibilizando-a para seu crescimento (RAMÍREZ, 2005)

Os metabólitos do sangue e as concentrações dos fluidos corporais também recebem influência da dieta, uma vez que o perfil metabólico do animal se altera no processo de digestão e absorção dos nutrientes. O metabolismo é uma ferramenta viável para analisar a relação entre os processos bioquímicos de digestão e seu resultado no organismo (LUNDSTEDT et al, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que alterações na hematopoiese (processo de formação e maturação dos elementos do sangue) podem ser um indicativo de influência da dieta sobre estes parâmetros (BICUDO; SADO; CYRINO, 2009).

Frente a todos estes desafios, conhecer as respostas hematológicas para diferentes dietas fornecidas pode ser útil para a formulação de dietas nutricionalmente balanceadas que proporcionem ao peixe seu máximo desempenho. As exigências nutricionais da maioria dos peixes normalmente são determinadas pelos ensaios em resposta a uma dose nutricional fornecida.

Devido aos desequilíbrios homeostáticos causados por diversos fatores, estabelecer padrões do estado imunológico das espécies de peixes tem sido cada vez mais complexo, pois as condições laboratoriais são bastante particulares. Apesar disto, têm-se um grande interesse em estabelecer os padrões imunes das espécies a fim de potencializar a resistência às doenças nos sistemas de criação e desenvolver novas metodologias e tecnologias que auxiliem esse trabalho (BALDISSEROTTO, 2002).

A resposta imune nos peixes divide-se em resposta inata, que consiste em impedir que patógenos acessem o organismo do hospedeiro, e resposta específica, que conta com uma memória imunológica capaz de induzir células do sistema de defesa a atacar patógenos (BERNSTEIN; SCHLUTER; MARCHALONIS, 1998).

Nos peixes, os fatores celulares e humorais que atuam tanto na imunidade inata quanto na específica, promovem proteção interna e externa contra agentes infecciosos e surtos epizooticos (IWAMA; NAKANISHI, 1996).

O estudo aprofundado do sistema imune dos peixes com o objetivo de se conhecer as vias de inoculação, os órgãos e tecidos linfoides, o perfil hematológico, a produção e afinidade dos anticorpos frente aos estímulos antigênicos são necessários, pois se conhece muito pouco a respeito deste complexo sistema, que é tão importante para o desenvolvimento e o desempenho dos animais, principalmente tratando-se de peixes carnívoros.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Adequações nas instalações

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Unesp, UNESP - Campus de Dracena. Foram utilizadas 24 caixas de polietileno com capacidade para 130 L de água. A instalação possui um aerador elétrico acoplado a mangueiras de silicone e pedras porosas para promover adequada concentração de oxigênio dissolvido às caixas de polietileno. Houve a utilização de aquecedores com termostatos para manutenção da temperatura da água constante (cerca de 28°C). Os tanques foram cobertos por tela sombrite, a fim de se reduzir o estresse, devido ao fato do surubim ser uma espécie de hábitos noturnos e conseqüentemente sensíveis à luz. A cada dois ou três dias, a matéria orgânica depositada no fundo das caixas foi removida através de sifonamento com uma mangueira de borracha.



## **2.2 Aquisições dos peixes**

Os juvenis de surubim (216 animais) com peso médio de 23 g e aproximadamente 15 cm foram adquiridos de produtores comerciais. Antes da fase experimental, os peixes foram aclimatados às condições laboratoriais por 48 dias em caixas de polietileno e alimentados três vezes ao dia com patê específico para treinamento alimentar. Este patê foi preparado com coração de boi e filé de tilápia triturado e moído, e as concentrações de ração farelada foram incluídas semanalmente, nos valores de 10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, de modo à 'ensinar' e adaptar os peixes a se alimentarem com dietas secas.

## **2.3 Dietas experimentais**

Foram formuladas seis dietas experimentais com suplementação mineral e vitamínica completa. As dietas foram: 38P/22CH; 38P/26CH; 38P/30CH; 42P/22CH; 42P/26CH; 42P/30CH.(Tabela 1).

As dietas foram preparadas no Campus de Dracena e consistiram inicialmente na trituração dos ingredientes em moinho de martelo (peneira de 0,8 mm) e misturados de acordo com a formulação. Posteriormente as dietas foram peletizadas e os grânulos secos em estufa a 40°C por 12 horas. Foram armazenados em potes plásticos e conservados em geladeira durante todo o experimento.

**Tabela 1** – Formulação e composição das dietas experimentais fornecidas aos híbridos de surubim por todo período experimental.

<i>Ingredientes</i>	<b>Dietas (P/CH)</b>					
	<b>38/22</b>	<b>38/26</b>	<b>38/30</b>	<b>42/22</b>	<b>42/26</b>	<b>42/30</b>
Farelo de soja	24,00	23,00	23,00	27,00	27,00	28,00
Farinha de peixe	34,6	34,60	34,60	37,00	38,00	38,40
Milho	5,70	6,00	5,50	4,40	4,50	1,80
F. vísceras de aves	8,00	8,60	9,00	10,00	9,25	8,00
Amido de milho pré-gelatinizado	12,50	17,00	21,50	12,50	17,00	22,55
Óleo de soja	2,80	2,50	2,55	0,20	0,00	0,00
Premix	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Celulose	1,70	1,70	1,80	1,50	1,50	0,00
Vitamina C	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Caolin	9,45	5,35	0,80	6,15	1,50	0,00
<b><i>Composição Centesimal</i></b>						
Matéria seca, %	89,80	89,30	88,80	89,20	88,60	88,30
Proteína bruta, %	<b>38,10</b>	<b>38,00</b>	<b>38,20</b>	<b>42,10</b>	<b>42,30</b>	<b>42,10</b>
Proteína digestível <sup>2</sup> , %	33,00	33,00	33,20	36,70	36,80	36,50
Extrato etéreo, %	7,70	7,50	7,60	5,60	5,40	5,20
Fibra bruta, %	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	1,80
Matéria mineral, %	8,80	8,90	8,90	9,70	9,70	9,60
Extrato não-nitrogenado, %	<b>22,50</b>	<b>26,40</b>	<b>30,00</b>	<b>22,40</b>	<b>26,40</b>	<b>29,40</b>
Energia bruta, Kcal kg <sup>-1</sup>	3.943	4.086	4.265	3.963	4.128	4.179
Energia digestível <sup>2</sup> , Kcal kg <sup>-1</sup>	3.175	3.258	3.394	3.174	3.280	3.330

<sup>1</sup>enriquecimento por quilograma de ração: Vit. A (3.000 UI); Vit. D3 (3.000 UI); Vit. E (200,00 mg); Vit. B1 (6,00 mg); Vit. B2 (8,00 mg); Vit. B6 (3,00 mg); Vit. B12 (20,00 mg); Vit. C (350,00 mg); Vit. K (6,00 mg); Ac. Fólico (1,00 mg); Ac. Pantotênico (20,00 mg); Biotina (0,10 mg); Cobre (10,00 mg); Ferro (100,00 mg); Iodo (5,00 mg); Manganês (70,00 mg); Niacina (100,00 mg); Zinco (150,00 mg); (150,00 mg); B.H.T. (125,00 mg); Colina (150,00 mg);

<sup>2</sup> Calculado a partir de Silva et al (2012).

## **2.4 Realização do experimento**

Após o período de aclimatação, os peixes foram mantidos em jejum (24 horas), coletados aleatoriamente, anestesiados com Eugenol (1 g 10 L<sup>-1</sup> de água), individualmente pesados em balança digital semi-analítica, medidos em ictiômetro e distribuídos nas 24 caixas de polietileno com capacidade para 130 L (09 animais/caixa).

Durante 60 dias, os peixes foram alimentados com as dietas experimentais, até a saciedade aparente, em três refeições diárias (19h; 22h e a 01h). Foi considerada saciedade aparente o momento em que os animais deixaram de consumir os peletes de ração, desta forma as rações foram fornecidas em pequenas porções/quantidades durante alguns minutos, com cautela e observação do comportamento animal, para desta forma evitar ao máximo sobra de ração. O consumo de ração foi medido através de pesagem dos recipientes de armazenagem de ração (potes) de cada caixa individual diariamente.

## 2.5 Desafio com lipopolissacarídeo (LPS)

Após 60 dias de experimento, com fornecimento até a saciedade aparente das dietas experimentais, os animais foram anestesiados com Eugenol (1g 10<sup>-1</sup> L de água) e desafiados por meio de injeção intraperitoneal de 0,1 mL da endotoxina LPS por grama de peixe (500 µg kg<sup>-1</sup> PV). A substância utilizada no desafio dos peixes foi o lipopolissacarídeo extraído da parede celular de *Escherichia coli* (026:B6, Sigma, St. Louis, MO, USA).

Neste período de desafio os animais continuaram a receber as dietas experimentais nos mesmos horários e até a saciedade aparente. No terceiro dia após o desafio foi colhido sangue para posteriores análises dos parâmetros hematológicos e imunológicos.

## 2.6 Biometrias e coletas de amostras experimentais

Para coleta de dados biométricos foram realizadas amostragens no início e aos 60 dias de experimento. Nestas biometrias, os peixes de cada parcela (caixa) foram anestesiados com eugenol (1 g 10 L<sup>-1</sup> de água), individualmente pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01 g e medidos em ictiômetro. Como parâmetros de desempenho produtivo, foram avaliados:

- Peso médio final (PF);
- Ganho em peso:

$$GP = \textit{peso médio final} - \textit{peso médio inicial}$$

- Ganho de Biomassa:

$$GB = \textit{ganho biomassa final} - \textit{ganho biomassa inicial}$$

- Taxa de crescimento específico:

$$TCE(\% \textit{ dia} - 1) = 100x \left[ \frac{\ln \textit{peso final} - \ln \textit{peso inicial}}{\textit{período experimental}} \right]$$

- Consumo de alimento (g);

- Conversão alimentar aparente:

$$CA = \frac{\textit{alimento fornecido}}{\textit{ganho de peso total}}$$

- Taxa de eficiência proteica:

$$TEP(\%) = 100x\left(\frac{\textit{ganho de peso}}{\textit{proteína bruta consumida}}\right)$$

A coleta do sangue foi realizada em três animais por repetição, totalizando 12 animais por tratamento. Foram realizadas duas amostragens, indicadas como AD (antes dos animais serem desafiados com LPS) e DD (depois dos animais serem desafiados com LPS). A coleta do sangue foi realizada através da punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis.

Seringas sem anticoagulante foram utilizadas e o sangue destinado à obtenção de soro foi utilizado para determinação da atividade de lisozima, atividade hemolítica do complemento, proteína total e albumina. Para a obtenção de sangue total, microtubos com anticoagulante (heparina sódica) foram utilizados para armazenamento de sangue que foi destinado a determinação da atividade respiratória de leucócitos, determinação do hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e índices hematimétricos (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos.

## **2.6.1 Indicadores do Sistema Imune não específico**

### **2.6.1.1 Atividade respiratória de leucócitos**

Para análise da atividade respiratória de leucócitos foi seguido o protocolo de Biller et al. (2013). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante “nitroblue tetrazolium” (NBT) que formam precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada em seguida e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1mL de N, N-dimetilformamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim provoca lise na parede celular dos leucócitos e dos grânulos de formazan liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

### **2.6.1.2 Atividade de lisozima**

A determinação da atividade de lisozima foi baseada no método clássico de causar lise uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e medida por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (SMOLELIS e HARTSELL, 1949). A lisozima tem capacidade de atuar sobre ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico de membranas de parede celular bacterianas, levando a sua lise e conseqüente destruição do patógeno (PAULSEN et al., 2003). A análise foi realizada por ensaio turbidimético, segundo Parry (1965) com adaptações.

A partir da curva padrão determinada utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha, foi quantificada as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta. Após a determinação de curva

de calibração, o soro dos peixes de todos os tratamentos, inicialmente, passaram por tratamento térmico (banho-maria a 56°C por 30 min) para inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo, assim, que a lise do *M. lysodeikticus* seja provocada exclusivamente por ação da lisozima. Assim, 50 µL soro (em triplicata) foram depositados em microplacas, de acrílico estéril de 96 cavidades, em 50 µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2), após homogeneizados, o soro será submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2, mantendo um volume final de 50 µL por cavidade. Em cada cavidade foi depositado 125 µL de suspensão de *M. lysodeikticus* (0,2% em tampão fosfato de sódio). A redução da densidade óptica, em 450 nm, foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 30°C. Os resultados em concentração (µg mL<sup>-1</sup> de amostra) foram obtidos a partir da redução da  $\delta$  DO para cada volume de amostra avaliada, e os resultados em unidade de atividade (U mL<sup>-1</sup>) foram determinados como a quantidade de enzima que produziu, em 450 nm, um  $\delta$  DO de 0,001 min<sup>-1</sup> (WON et al., 2004).

### **2.6.1.3 Atividade hemolítica do complemento - via alternativa**

A determinação da atividade hemolítica do complemento – via alternativa foi determinada de acordo com metodologia previamente descrita por Biller et al (2012). Uma alíquota de sangue total de carneiros foi misturada a um mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante foi filtrada em gaze estéril para retirada de material suspenso. A solução filtrada será adicionado o mesmo volume do agente quelante TEA-EDTA (trietanolamina - ácido etileno diaminotetracético) 10 mM, pH 7,4 e gelatina a 0,1%, e esta solução foi incubada por 15 min, a 37°C, e centrifugada a 2500 rpm, por 10 min, a 4°C, para separação dos eritrócitos. Os eritrócitos foram, então, ressuspensos em tampão TEA – Mg<sup>2+</sup> 2 mM, pH 7,4 e lavados com o mesmo tampão por 3 vezes após centrifugação (2500 rpm, por 10 min, a 4°C). Os eritrócitos, depois da última centrifugação, foram ressuspensos em solução de Alséver e armazenados a -10°C, sendo viável por até 15 dias. No momento da utilização, parte da suspensão de eritrócitos armazenada foi lavada duas vezes com tampão TEA-EGTA (trietanolamina - ácido etileno glicoltetracético) 8 mM e Mg<sup>2+</sup> 2 mM, com gelatina 0,1% (2500 rpm, por 10 min,

a 4°C) e ressuspensos em tampão TEA-EGTA 1%, em densidade óptica entre 0,8 e 0,9, a 700 nm.

A padronização da metodologia foi realizada com soro de peixes em diversas diluições (1:10; 1:15 e 1:20 do volume total de reação de 600 µL, em tampão TEA-EGTA 8 mM e Mg<sup>2+</sup> 2 mM, com gelatina 0,1%. A análise da atividade hemolítica do complemento foi realizada pela mistura de 200 µL de cada diluição de soro com 400 µL da suspensão de eritrócitos, a qual foi submetida à leitura da absorbância em comprimento de onda de 700 nm, por 10 min, em espectrofotômetro provido de banho a 37°C (Beckman DU-70S). Após a padronização da diluição do soro a ser utilizada, 60 µL de soro de peixes de todos os tratamentos, na diluição de 1:10, foram adicionados a 140 µL de tampão TEA-EGTA 8 mM e Mg<sup>2+</sup> 2 mM, com gelatina 0,1%, e a essa mistura serão acrescentados 400 µL da suspensão de eritrócitos. A solução foi, então, submetida à leitura em espectrofotômetro.

Uma alíquota de soro foi aquecida a 56°C, por 30 min para controle negativo da atividade do sistema complemento.

### **2.6.2 Proteína total, albumina e globulina sérica**

A concentração de proteína total foi determinada no soro pelo método do Biureto (CAIN e SKILLETER, 1987) e a de albumina pelo método colorimétrico – verde de bromocresol (Albumina 19, Labtest, Lagoa Santa, MG). A globulina foi determinada subtraindo a albumina da proteína total.

### **2.6.3 Parâmetros Hematológicos**

No sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos (NE), concentração de hemoglobina (Bioclin K023, Quibasa química básica, Belo Horizonte, MG), volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem total e diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, célula granulocítica especial

(CGE) ou leucócito granular PAS (LG-PAS) e basófilo) em extensões sanguíneas.

As amostras sanguíneas homogeneizadas foram introduzidas em capilares para microhematócrito para determinação do hematócrito. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 g em centrífuga de microhematócrito e a avaliação foi feita com o auxílio da tabela de microhematócrito.

Para a contagem do número de eritrócitos, alíquotas de sangue de cada animal foram coletadas e diluídas em tampão formol citrato na contração de 1:200. Após a homogeneização da solução a contagem foi feita em câmara de Neubauer.

Extensões sanguíneas de cada animal foram feitas em lâminas de vidro com extremidade fosca e deixadas para secar ao ar e submetidas à coloração com Panótico Rápido (Panótico Rápido LB 170117, Laborclin Produtos para Laboratório Ltda. Pinhais, PR) A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz no aumento de 100x, com óleo de imersão. A contagem total dos leucócitos e dos trombócitos foram realizadas por método indireto, pela quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas obtido no contador de células. Já para a contagem diferencial de leucócitos foram contadas 200 células e estimado para o total de leucócitos.

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

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

Para o cálculo do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

$$VCM (fL) = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{número total de eritócitos}}$$

$$CHCM(g. dL^{-1}) = \frac{\text{concentração da hemoglobina} \times 100}{\text{hematócrito}}$$

$$HCM = \frac{\text{hemoglobina} \times 10}{N^{\circ} \text{de hemácias}}$$

## 2.7 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo realizado um sorteio aleatório dos tratamentos para as caixas após o período de aclimação dos peixes uma vez que a variabilidade entre as parcelas no laboratório foi muito pequena. Ao todo, foram utilizados 216 animais, distribuídos em 24 caixas, totalizando nove animais/caixa.

## 2.8 Análise Estatística

Após a tabulação dos dados, os resultados foram submetidos a análise de variância e, quando verificada diferença estatística, aplicou-se o teste de Duncan a 5% de significância para comparação de média através do programa estatístico SAS, versão 9.0.

### 3 RESULTADOS

Não foram observadas diferenças significativas para o ganho em biomassa, a taxa de crescimento específico, consumo total, conversão alimentar e taxa de eficiência protéica. Os peixes que receberam a dieta 38P/22CH apresentaram valores relativamente maiores para comprimento padrão, peso final e ganho de peso. Para os mesmos parâmetros, os peixes alimentados com a dieta 38P/30CH obtiveram menor desempenho, seguidas das dietas 42P/22CH e 42P/26CH nos parâmetros peso final e ganho de peso (Tabela 1)..

Nos parâmetros imunológicos foram observadas que os teores de albumina, atividade respiratória dos leucócitos e atividade do sistema complemento não apresentaram diferenças significativas entre as dietas. Para proteína e globulina, a dieta 38P/30CH obteve melhores resultados comparados as demais dietas. Na atividade da lisozima a dieta 38P/30CH também obteve melhores resultados, expressivamente quando comparados com as dietas 38PB/22CH e 38PB/26CH, como apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que os índices de proteína e globulina, não sofreram influência do desafio com LPS. Antes de serem desafiados, os peixes apresentaram valores significativamente maiores para albumina e atividade do sistema complemento; já para a atividade respiratória dos leucócitos e lisozima, a melhora foi observada somente após o desafio independentemente das dietas.

As concentrações de eritroblastos, linfócitos, eosinófilos, volume corpuscular médio e concentração da hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Os peixes alimentados com a dieta 38P/26CH, obtiveram resultados maiores para os índices de eritrócitos, trombócitos e monócitos. Para aqueles alimentados com a dieta 42P/30CH os valores de leucócitos, neutrófilos e basófilos foram significativamente maiores. A inclusão níveis crescentes de carboidratos não alterou as concentrações de hemoglobina e hematócrito plasmática dos juvenis híbridos de surubim antes de serem desafiados com o LPS. Quando analisada a influência do desafio, todos os parâmetros exceto o volume corpuscular médio obtiveram resultados expressivamente maiores após os animais serem

desafiados, mostrando a capacidade de resposta do animal frente a um patógeno.

Para os índices de hemoglobina e hematócrito, representados nas Figuras 1 e 2, não foram observadas diferenças estatísticas entre as dietas antes dos peixes serem desafiados com LPS. Após o desafio, os animais que receberam a dieta 38P/22CH, apresentaram diferenças significativas quando comparados àqueles que receberam a dieta 38P/30CH; 42P/26CH; 42P/30CH. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos da dieta 38P/22CH; 38P/30CH; 38P/26CH, ainda sim, a dieta 38PB/22CHO apresentou resultados numericamente maiores comparados aos demais (Tabela 3).

Tabela 1. Valores médios, erro padrão (SEM) e valor de P dos parâmetros de desempenho produtivo do surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) após 60 dias de alimentação com diferentes proporções de proteína/carboidrato na dieta.

	DIETAS (P/CH)						SEM	one-way ANOVA
	38/22	38/26	38/30	42/22	42/26	42/30		Dietas
Comprimento Padrão (cm)	25,8a	24ab	22,6b	23,8ab	23,4ab	23,5ab	0,35	0,1668
Peso Final (g)	113a	90,5ab	79,5b	86,9b	77,2b	94,5ab	3,79	0,0620
Ganho de Peso (g)	90,7a	67,8ab	58,8b	65,3b	57,1b	74,2ab	3,66	0,0701
Ganho de Biomassa (g)	86	67,8	58,8	65,3	63,9	68,0	3,5	0,3331
Taxa de Crescimento Específico (cm)	2,69	2,28	2,21	2,32	2,26	2,38	0,06	0,3491
Consumo total (g/peixe)	175,5	169,5	161,7	169,3	176,6	164,9	2,95	0,7137
Conversão alimentar (g)	2,09	2,61	2,94	2,63	2,93	2,61	0,15	0,6853
Taxa de Eficiência Proteica (%)	0,86	1,08	1,21	1,09	1,21	1,08	0,06	0,6853

Média (n=12). Letras distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2. Valores médios, erro padrão (SEM) e valores de P dos parâmetros imunológicos do surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) após 60 dias de alimentação com diferentes proporções de proteína/carboidrato na dieta e desafio com LPS.

	DIETAS (P/CH)						COLETAS		SEM	Two-way ANOVA		
	38/22	38/26	38/30	42/22	42/26	42/30	AD	DD		Dietas	Coleta	Interação
Proteína(g dL <sup>-1</sup> )	105,04b	120,95b	165,61a	124,89b	105,63b	97,65b	112,57	127,36	5,903	0,0119	0,2004	0,8564
Albumina(g dL <sup>-1</sup> )	4,81	5,65	5,37	5,13	4,68	5,02	5,65a	4,57b	0,139	0,2873	<.0001	0,4050
Globulina(g dL <sup>-1</sup> )	100,22b	115,29b	160,23a	119,76b	100,95b	92,62b	106,91	122,78	5,890	0,0128	0,1686	0,8605
BURST* (DO)	0,31	0,31	0,31	0,33	0,3	0,3	0,16b	0,44a	0,013	0,1094	<.0001	0,1047
Lisozima(U mL <sup>-1</sup> )	415,6c	804,5ab	1026,7a	389,4c	805,5ab	714,8b	478,40b	867,22a	45,333	<.0001	<.0001	0,1003
Complemento	165,98	152,27	169,71	152,27	153,2	153,08	183,23a	142,15b	9,069	0,9172	0,0255	0,5344

Média (n=12). Letras distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05). \*BURST = atividade respiratória dos leucócitos

Tabela 3. Valores médios, erro padrão (SEM) e valores de P dos parâmetros hematológicos do surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) após 60 dias de alimentação com diferentes proporções de proteína/carboidrato na dieta e desafio com LPS.

	DIETAS (P/CH)						COLETAS		SEM	Two-way ANOVA		
	38/22	38/26	38/30	42/22	42/26	42/30	AD	DD		Dietas	Coleta	Interação
Eritrócitos ( $\times 10^6$ mm <sup>-3</sup> )	1,68b	1,93a	1,89ab	1,93a	1,84ab	1,84ab	1,74556b	1,96938a	0,0340013	0,2308	0,0009	0,7182
Eritroblastos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	79234	88397	93657	91647	87949	88328	61639b	114765a	3099,29	0,5160	<.0001	0,6484
Leucócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	275440a	240292b	250624ab	243589b	240711b	285353a	221513b	290490a	6024,5	0,0465	<.0001	0,7095
Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	186304b	228665a	208672ab	214634ab	202933ab	189608b	176866b	233406a	4933,13	0,0505	<.0001	0,8031
Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	235046	203313	220259	207954	206382	236819	190865b	245726a	5097,07	0,1207	<.0001	0,6989
Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	20328b	15080d	15966cd	19848cb	16830cbd	32117a	17422b	22634a	771,3854	<.0001	<.0001	0,8526
Monócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	12318ab	14609a	7221c	7391c	10340bc	6796c	8293b	11266a	565,8597	<.0001	0,0043	0,8375
Eosinófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	3273,5	3009,3	2943,2	3260,7	3287,8	3553,7	1871b	4571,8a	194,5765	0,9060	<.0001	0,4269
Basófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	4474,4ab	4279,2ab	4234,5ab	5135,8ab	3871,4b	6066,5a	3062,2b	6291,8a	276,4387	0,1099	<.0001	0,7383
VCM*(mm <sup>-3</sup> )	174,94a	139,93b	142,34b	138,12b	142,63b	130,95b	155,279	136,690	3,3154	0,0255	0,3944	0,5449
HCM*(pg)	56,630a	43,478b	44,573b	43,893b	44,134b	39,882b	34,287b	56,576a	1,7159	0,0025	0,0032	0,5507
CHCM* (g/dL)	34,268	33,858	31,653	32,311	34,474	33,211	22,198b	42,387a	1,6145	0,9765	<.0001	0,9353

Média (n=12). Letras distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05). \*VCM = volume corpuscular médio. HCM = hemoglobina corpuscular média. CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

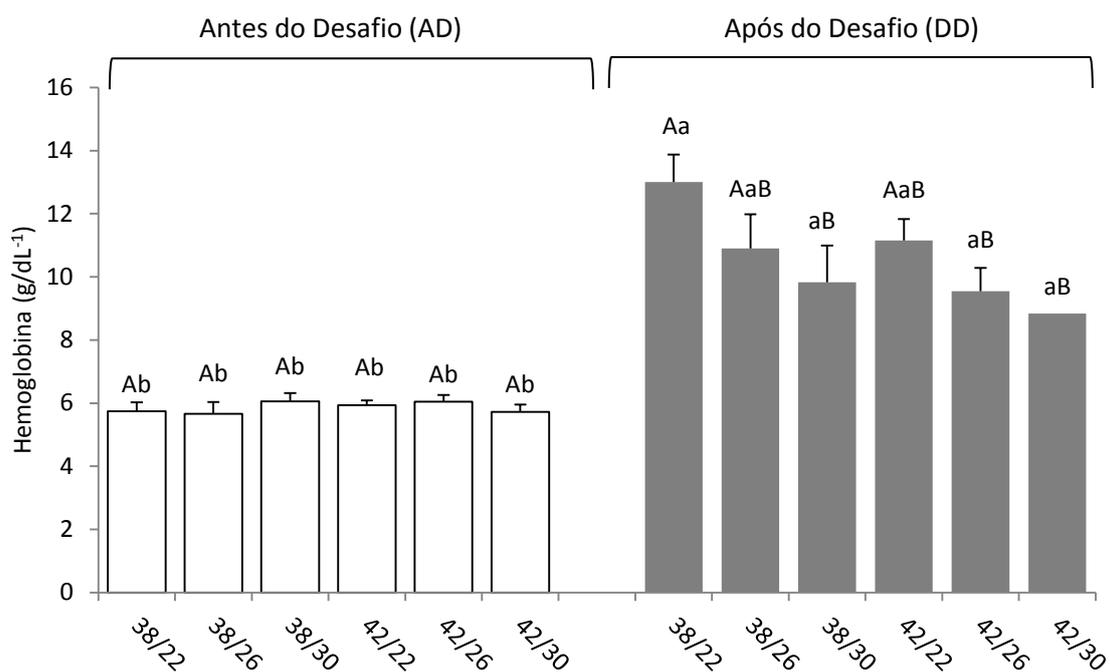


Figura 2: Valores médios de Hemoglobina (g/dL-1) dos híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) alimentados com diferentes níveis de relação carboidrato/proteína na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

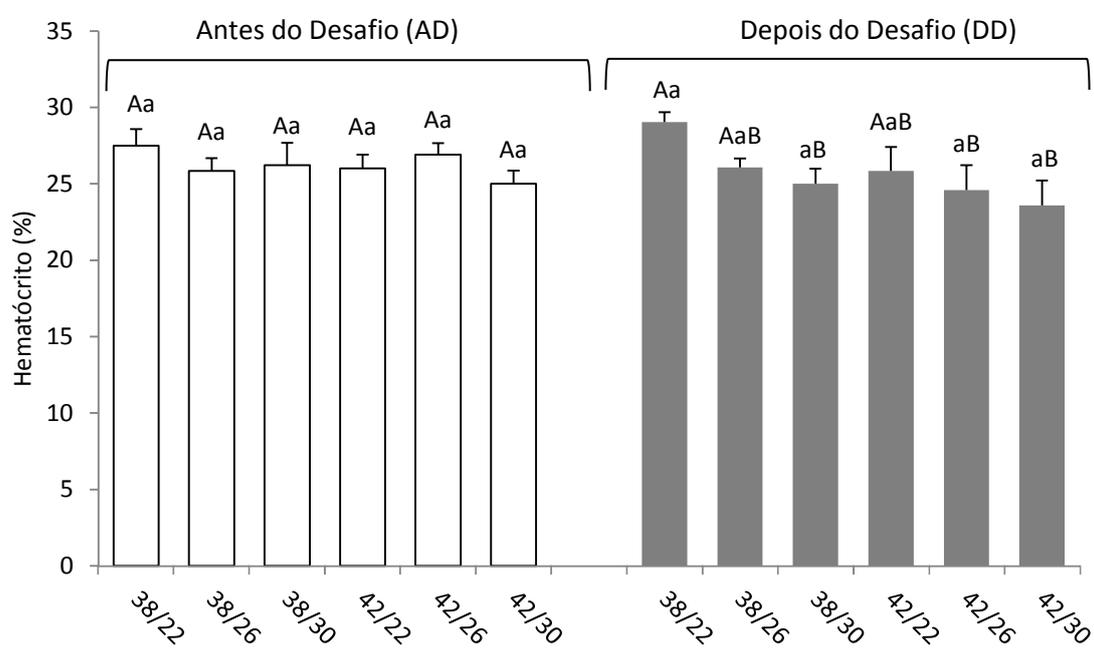


Figura 3: Valores médios de Hematócrito (%) dos híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma sp*) alimentados com diferentes níveis de relação carboidrato/proteína na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

As exigências com relação à utilização de carboidratos nas dietas para peixes tropicais de água doce ainda não foram completamente estabelecidas. Entretanto, no presente trabalho foi possível observar que os surubins (*Pseudoplatystoma* sp) alimentados com a dieta contendo 38P/22CH apresentaram maior comprimento padrão quando comparados aos demais grupos. Sendo esta descoberta importante para os futuros trabalhos, pois a utilização de carboidratos em níveis adequados para cada espécie pode proporcionar adequado crescimento. Este fato já foi observado em algumas espécies de peixes, principalmente carnívoros marinhos de águas frias, tais como o salmão do Atlântico (HEMRE et al., 1995) e a truta arco-íris (PERAGON et al., 1999), nos quais a utilização de carboidratos na dieta como fonte de energia foi uma alternativa que gerou bons resultados, e uma economia de ração (HUNG e STOREBAKKEN, 1994; ENES et al., 2008).

Entre os grupos que consumiram dietas com níveis de PB e CHO mais elevados (42P/26CH e 42P/30CH), apesar de não apresentarem diferenças significativas quando comparadas com os demais grupos alimentados com as outras dietas, entre si, pode-se perceber que numericamente houve um pequeno aumento no consumo total de ração, ao contrário do que ocorre com os grupos que receberam dietas com níveis de PB menores, que apresentaram uma queda no consumo relativa ao aumento de CHO na dieta.

Os valores de ganho de peso (GP) diminuíram significativamente de acordo com o aumento dos níveis de CHO e PB da dieta, e a mesma relação foi observada em um trabalho realizado por Bicudo, Sado e Cyrino (2009), que avaliaram crescimento e parâmetros hematológicos em pacu (*P. mesopotamicus*) alimentados com dietas em diferentes níveis de CHO e PB. Os autores indicam que provavelmente os baixos níveis protéicos da dieta foram os responsáveis por essa queda no ganho de peso, na relação PB x CHO. Ainda no mesmo estudo, a taxa de crescimento específico seguiu o mesmo padrão do ganho de peso, reduzindo conforme os níveis de CHO e PB da dieta aumentavam.

A palatabilidade da dieta exerce influência direta sobre o consumo de ração por parte dos peixes. Especificamente para o surubim, que é um bagre

carnívoro, é de extrema importância que a ração fornecida seja palatável, pois esta espécie apresenta muitos botões gustativos nos barbilhões tácteis localizados próximos a boca (CAMPOS 2010), podendo esta ser uma causa para a queda de consumo relacionada ao aumento de CHO na dieta.

Em um estudo realizado por Del Carrote (2001), foram utilizados níveis crescentes de amido na dieta para avaliar o desempenho produtivo, digestibilidade e metabolismo energético de juvenis de pintado (*P. corruscan*), entretanto para a inclusão deste amido foi necessária a utilização de gelatina como veículo inerte nas rações, e foi observado que a gelatina prejudicou a palatabilidade da dieta.

O amido, quando processado (cozido ou gelatinizado), possui uma digestibilidade maior comparado à sua forma crua, e este processamento exerce influência sobre o crescimento dos peixes (WILSON 1994). Por esta razão, a fonte de carboidrato utilizada neste experimento foi o amido de milho pré-gelatinizado.

No presente estudo, algumas respostas imunes foram avaliadas, dentre elas a atividade respiratória de leucócitos, que avalia a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos fagócitos competentes, para destruição de patógenos invasores; e foi possível observar que as diferentes concentrações de proteína/carboidrato não influenciaram a resposta de defesa oxidativa dos peixes. Entretanto, após os peixes serem desafiados com LPS, a atividade respiratória dos leucócitos diminuiu significativamente, independentemente da dieta, indicando que esta resposta de defesa foi suprimida, possivelmente para evitar a superprodução de radicais livres, e conseqüentemente o estresse oxidativo (BILLER-TAKAHASHI et al., 2015).

O sistema imunológico dos peixes é capaz de reconhecer substâncias exógenas através de receptores existentes nas células de defesa, que identificam proteínas e moléculas específicas de micro organismos. O LPS é conhecido por estimular estas proteínas, como a lisozima e as proteínas do sistema complemento, e algumas células como os linfócitos B e T, atuando diretamente nos parâmetros inatos de defesa.

Os resultados para lisozima diferiram estatisticamente entre si quando levado em consideração as dietas. Observa-se que ao passo que os níveis protéicos da dieta eram mantidos iguais, e suplementados o carboidrato, a

concentração de lisozima apresentou-se numericamente maior para as dietas com níveis de carboidrato maiores. Para as coletas, após os peixes serem desafiados, os valores na concentração de lisozima praticamente dobrou quando comparados antes do desafio, demonstrando a capacidade que os animais tiveram de responder após o reconhecimento do patógeno através das proteínas que compõem esse sistema a fim de defender o organismo contra o invasor.

Em um estudo realizado com tilápia do Nilo, suplementadas com Actigen®, foi observado que a atividade da lisozima foi influenciada pelo tempo de coleta, exceto aos 5 dias após o desafio, apresentado valores mais elevados em comparação aos 12 dias, confirmando que o LPS atua de forma precoce (HA, 2015). Para o sistema complemento, no presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre as dietas, mostrando que a inclusão de carboidratos dietéticos em níveis crescentes não influenciou este parâmetro do sistema imune dos peixes. Resultado semelhante foi observado em tilápia do Nilo suplementadas com Actigen®, cuja dietas também não apresentaram influencia para sobre as proteínas do sistema complemento aos 60 dias de experimento, entretanto foi observada uma influência aos 30 dias de experimento (HA, 2015).

Outro parâmetro muito utilizado na avaliação homeostática do organismo é o hematológico, pois indicam a capacidade de qualquer organismo em responder a agentes infecciosos, sejam eles de natureza bacteriana, viral ou fúngicas. Esta resposta é muitas vezes mediada por células sanguíneas provenientes de uma célula pluripotente. O processo de produção destas células é conhecido como hematopoiese. Após serem formadas, estas células se diferenciam em várias outras, como por exemplo, eritrócitos, granulócitos, leucócitos, linfócitos, trombócitos, etc., diretamente dependente do estímulo recebido (METCALF, 1995; EVANS, 1997).

O estudo hematológico dos peixes do presente estudo foi realizado, e o maior hematócrito foi encontrado nos peixes que receberam a dieta 38P/22CH. A avaliação do hematócrito determinado pelo percentual de eritrócitos em relação ao volume total de sangue evidencia uma melhor resposta do organismo frente à dieta, uma vez que valores baixos de HTC indicam anemia (MARTINS et al., 2004). Entretanto, independente da dieta, o desafio com LPS

não influenciou no hematócrito mostrando a ausência de resposta mesmo após condições estressantes (BARTON, 2000).

A partir da dieta 38P/22CH, pode ser observado um aumento significativo para número de eritrócitos, evidenciando uma tentativa do organismo em manter a homeostase, com produção adequada de células vermelhas, que são fundamentais para trocas gasosas e respostas à demanda de produção de energia. Por outro lado, a concentração de hematócrito nos surubins não apresentou diferença significativa antes e após o desafio. Os grupos alimentados com as dietas 38P/30CH; 42P/26CH e 42P/30CH apresentaram os mais baixos percentuais de hematócrito após serem desafiados, comparados aos demais grupos. Já para os valores de hemoglobina, foi observada diferença entre antes e após o desafio, em que os peixes apresentaram uma resposta significativa na concentração de hemoglobina. O desafio com LPS, evidenciou uma tentativa do organismo em responder ao estímulo antigênico, mesmo em uma condição fisiológica sub-ótima, resultando em aumento dos eritrócitos, hemoglobina eritroblastos e índices hematimétricos (CHCM, HCM), ou seja, os surubins mobilizaram energia para produção e manutenção dos parâmetros hematológicos em uma situação estressante.

Weiss et al. (2010) afirmam que a concentração da hemoglobina pode variar entre 5 e 10 g dL<sup>-1</sup> dependendo da espécie, concentração bastante inferior quando comparada a dos mamíferos. No presente trabalho, as concentrações de hemoglobina se mantiveram dentro desta faixa, com valores entre 7,28 à 9,37 g dL<sup>-1</sup>, porém, foram contraditórios a um estudo realizado por Fagundes e Urbinati (2008), que avaliaram a concentração de hemoglobina de *P. curruscans* com peso médio de 14,0; 24,9 e 44,8 g, obtendo concentrações de 10,5; 8,0 e 10,1 g dL<sup>-1</sup>, respectivamente. Tavares Dias et al. (2009) encontraram concentrações na faixa de 5,2 a 6,2 g dL<sup>-1</sup> de hemoglobina para os híbridos do gênero *Pseudoplatystoma* (*P. fasciatum* x *P. curruscans*) com peso médio entre 568,0 e 1350,0 g.

Já a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) para híbridos de surubim, Tavares Dias et al. (2009) encontraram uma faixa de normalidade entre 16,8 a 18,8 g/dL. No presente trabalho encontrou-se valores médios um pouco acima da faixa média estabelecida por Tavares Dias et al.

(2009). Para Weiss et al. (2010), a faixa de normalidade já se aproxima mais dos resultados encontrados neste trabalho, estando na faixa de 18,0 a 30,0 g dL<sup>-1</sup>. Algumas respostas eritrocitárias estão relacionadas a um quadro anêmico do animal, que pode ser observadas como uma discreta diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Inúmeros são os fatores que podem interferir nos índices hematológicos dos peixes, bem como nos valores de células brancas de defesa (WENDEMEYER, 1996). Estímulos estressores podem causar um aumento na concentração sanguínea de catecolaminas, o que resulta em alterações nas variáveis sanguíneas, podendo esta ser uma boa ferramenta de identificação de variação homeostática do organismo frente a um agente estressor (RAILO et al., 1985; SATAKE et al., 2009; TAVARES DIAS et al., 2009).

As células brancas de defesa ou os leucócitos são um importante indicador da saúde do peixe devido a sua importância no sistema imune inato e adquirido. No presente estudo, o aumento no número de leucócitos e trombócitos foram observados proporcionalmente ao aumento da quantidade de carboidratos incluídos na dieta. Esta resposta pode ser devido ao aumento nos teores de carboidratos dietéticos, causando estresse metabólico nos animais, pois a gelatinização do amido leva ao aumento na absorção de glicose no intestino. O mesmo perfil foi observado após o desafio, no qual o estresse extra promoveu aumento significativo destas células, independente do nível de carboidrato na dieta, enfatizando a resposta inata mediada pelos leucócitos contra a infecção bacteriana simulada pelo LPS.

Em relação aos linfócitos, estes se mantiveram iguais para todos os tratamentos, aumentando apenas após desafio com LPS. Normalmente em situações estressantes, há a presença de linfopenia, entretanto nem a dieta ou o desafio foram suficientes para estabelecer o perfil linfocitário normalmente observado durante estresse (SILVA et al., 2012). Já para os valores de neutrófilos, os peixes do grupo alimentado com 42P/30CH apresentou neutrofilia, perfil normalmente encontrado em condições de estresse, neste caso a dieta era o fator de estresse. O mesmo perfil de neutrofilia foi observado após a injeção de LPS, evidenciando que o LPS foi um componente efetivo para utilização como fator de desafio. A definição destes perfis de respostas celulares é muito importante para futuros estudos, uma vez que esta é uma

espécie de difícil manejo, e esta informação de que há manutenção no número de linfócitos mesmo após a manipulação da dieta, facilitará o uso de protocolos experimentais, ou de manejos imunoestimulante (como imunizações ou administração de imunoestimulantes), que respondem melhor quando o sistema de defesa está em condição ótima.

Os monócitos dos surubins, também foram influenciados pelas dietas, além de um aumento geral no pós-desafio comparados ao período antes do desafio, sofrendo influência causada devida a infecção de LPS extraído de *E. coli*. Já os eosinófilos constituem um grupo importante de leucócitos, pois atuam nos processos inflamatórios e na defesa celular, estando distribuídos por todo tecido conjuntivo; no caso de infestação parasitária, localizam-se principalmente no trato gastro intestinal; nas brânquias e corrente sanguínea (KLEIN, 1990). Nos peixes, a concentração de eosinófilos no sangue periférico é frequentemente baixa (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). A determinação do tipos celulares é muito importante, pois a produção de células sanguíneas pode estar ligado tanto à resposta inata, quanto a resposta específica do sistema imune dos peixes..

Os carnívoros, quando adaptados, possuem habilidades para digerir polissacarídeos incluídos na dieta (HALVES e HANDY 2002). O surubim, especificamente, é capaz de utilizar o amido como uma fonte energética eficiente, porém ainda são necessários maiores estudos que encontrem a melhor fonte de carboidrato e em qual nível ele pode ser incluído na dieta (MARTINO et al. 2005).

Entre os autores que estudam e avaliam esse metabolismo energético do carboidrato em peixes carnívoros, é consenso que a qualidade do amido é determinante no desempenho do animal. Os concentrados energéticos vegetais, por exemplo, possuem baixa digestibilidade para os surubins, sendo encontrados níveis inferiores a 50% para o farelo de trigo, o milho e glúten de milho (GONÇALVES e CARNEIRO 2003; SILVA 2013). Em um estudo realizado por Takahashi e Cyrino (2006) para avaliar diferentes níveis de inclusão de carboidratos na dieta para o pintado (*P. curruscans*), os autores puderam concluir que a inclusão de até 29% de carboidrato na dieta não causa prejuízo ao desempenho zootécnico do animal.

Os peixes carnívoros não apresentam cecos pilóricos definidos, possuem intestino relativamente curto e o tempo de trânsito gastrointestinal é bem menor comparado com espécies herbívoras e onívoras (ROTTA, 2003), tornando a capacidade de hidrólise intestinal de carboidratos mais complexos restrita, limitando a digestão e absorção deste nutriente (HEROLD et al., 1995). Outro possível fator que possa ter limitado a utilização dos carboidratos por parte dos peixes, é a hiperglicemia pós-prandial prolongada, normalmente observada em peixes carnívoros com uma dieta rica em carboidratos (WILSON, 1994, LEGATE et al, 2001). Uma alternativa capaz de potencializar a digestão e absorção dos carboidratos pelos carnívoros é a gelatinização do amido aumentando a área de ação enzimática dentro do intestino do peixe. A gelatinização é um processo de pré-cozimento do amido, tornando-o mais possível de ser digerido (ROTTA, 2003).

Atualmente, poucos trabalhos relatam as exigências nutricionais de juvenis de surubim. Alguns dados referentes às exigências do pintado (*P. corruscans*) e do cachara (*P. fasciatum*) mostram a necessidade energética e protéica para a espécie. É considerado ideal que a concentração de proteína digestível (PD) seja de 39%, tendo energia digestível (ED) 3600 kcal/kg (SILVA 2013); e outros trabalhos recomendam que a proteína bruta (PB) seja 49,25% e energia bruta (EB) 4600 kcal/kg (CORNÉLIO et al, 2014).

Muitos trabalhos têm discutido as respostas fisiológicas dos peixes, tais como as respostas hematológicas e imunológicas após a alimentação com diferentes proporções de nutrientes, além dos estudos relativos aos agentes químicos, manejo, densidades populacionais altas e à inoculação de patógenos (COSTA et al., 2004; GONÇALVES, 2009). Estas informações são utilizadas para avaliar o estado fisiológico e sanitário dos peixes a fim de padronizar as condições ideais para as particularidades de cultivo de cada espécie (ROSOL e CAPEN, 1997; TAVARES DIAS et al., 2000).

## **5 CONCLUSÃO**

As diferentes relações de proteína e carboidrato nas dietas resultaram em respostas produtivas diferentes, sendo observada melhor resposta nos peixes que receberam a dieta 38P/22CH, reforçando a importância de um adequado balanceamento entre os componentes da dieta. Por outro lado não foi observado um comprometimento da condição fisiológica do animal, mostrando a capacidade desses animais em responder ao desafio com LPS.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Editora UFSM, 2002.

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000.

BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. Immunity. In: EVANS, D.H. **The physiology of fishes**. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. p. 215-242.

BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P.; Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. **Aquaculture Research**. v. 40, p 486-495. 2009.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C.; Hemolytic activity of alternative complement system as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 237-241, 2012.

BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., SAITA, M. V., GIMBO, R. Y.;URBINATI, E. C., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 2, (in press).

BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L.S., MINGATTO, F. E., URBINATI, E.C. The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish&ShellfishImmunology**, v. 47, p. 360-367, 2015.

BURKERT, D.; ANDRADE, D. R.; SIROL, R. N.; SALARO, A. L.; RASGUIDO, J. E. A.; QUIRINO, C. R. Rendimento do processamento e composição química de files de surubim cultivado em tanque-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 7, p. 1137-1143, 2008.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds), **Biochemical Toxicology**, Oxford, IRL Press, p.217-254, 1987.

CAMPOS, J. L. 2010. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes (Orgs.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 335-361.

CORNÉLIO, F. H. G.; CUNHA, D. A.; SILVEIRA, J. 2014. Dietary protein requirement of juvenile cachara catfish, *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 45(1).

COSTA, O. F. T.; FERREIRA, D. J. S.; MENDONÇA, F. L. P.; FERNANDES, M. N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 231, p. 627-636, 2004.

DEL CARRATORE, C. R. 2001. **Desempenho produtivo, digestibilidade e metabolismo energético de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscan*) alimentados com níveis crescentes de amido**. Tese (Doutorado) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal.

ENES, P.; PANNSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Hepatic glucokinase and glucose-6-phosphatase responses to dietary glucose and starch in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles reared at two temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, n. 1, p. 80-86, 2008.

EVANS, T. Developmental biology of hematopoieses. **Hematology and Oncology of Clinic North America**, v. 11, n. 6, p. 1115-1147, 1997.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E. C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v. 276, p. 112–119, 2008.

FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista AquaTic**, v. 16, 2002.

GONÇALVES, A. **Hematologia e macrófagos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.** 2009. 65f. Tese (doutorado) – Centro de Aquacultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GONÇALVES, E. G.; CARNEIRO, D. J. Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 779-786, 2003.

HA, N. **Imunomodulação por Actigen® em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): respostas fisiológicas, e desempenho produtivo após desafio com LPS.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Anima). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Dracena, SP.

HUNG, S. S. O.; STORREBAKKEN, T. Carbohydrate Utilization by Rainbow Trout Is Affected by Feeding Strategy. **Journal of Nutrition**, v. 124, n. 2, p. 223-230, February 1, 1994.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish Immune System. **Fish Physiology**, v. 15, 1996.

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

KLEIN, J.; SATO, A.; NIKOLAIDIS, N. MHC, TSP, and origin of species: from immunogenetics to evolutionary genetics. **Annual Rev Genetic** v.41, p.281–304. 2007.

LEGATE, N. J.; BONEN, A.; MOON, T. E. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla Anguilla*), and black bulhead catfish (*Ameiurus melas*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, p. 48-59, 2001.

LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and**

Physiology. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 137, p. 331-339, 2004.

MARTINO, R. C.; CYRINO, J. E. P.; PORTZ, L.; TRUGO, L. C. Performance carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 11; p.131–137, 2005.

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.

METCALF, D.; NICOLA, N. A. **The hematopoietic colony-stimulating factors**: From biological to clinical applications. New York: Cambridge University Press. 1995.

PERAGON, J.; BARROSO, J. B.; GARCIA-SALGUERO, L.; HIGUERA, M.; LUPIÁÑEZ, J. A. Carbohydrates affect protein-turnover rates, growth, and nucleic acid content in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 179, n.1-4, p. 425-437, 1999.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.74-169.

RAILO, E.; NIKINMAA, M.; SOIVIO, A. Effects of sampling of blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Richardson. **Journal of Fish Biology**, v. 26, p. 725-732, 1985.

ROSOL, T. J.; CAPEN, C. C. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. In: Kaneko J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. Cap. 23, p. 619-702.

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestório dos peixes relacionais à piscicultura**. EMBRAPA-CPAP. Corumbá, MS, p.48. 2003.

ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S. F.; MARTINO, R.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 34, n. 1, p. 28–34, 2003.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In.: TAVARES DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009, 330-450p.

SILVA, R. D.; ROCHA, L. O.; FORTES, B. D. A.; VIEIRA, D.; FIORAVANTI, M.C.S. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.v. 32, 99-107, 2012.

SILVA, T. S. C. **Exigências em proteína e energia e avaliação de fontes proteicas alternativas na alimentação do cachara *Pseudoplatystoma fasciatum***.Tese(Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 2013.

TAVARES DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; SILVA, E. D.; MARTINS, M. L., MORAES, F. R. Características Hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) Cultivada Intensivamente em “Pesque-Pague” do Município de Franca, São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, v. 16, p. 78-82, 2000.

TAVARES-DIAS, M., M. M. ISHIKAWA, M. L. MARTINS, F. SATAKE, H. HISANO, S. B. PÁDUA, G. T. JERÔNIMO & A. R. SANT ANA. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: Saran-Neto; Mariano, W.S.; Pozzobon-Soria. **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009, cap. 3, 43-80 p.

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

WEISS, D. J.; WARDROP, J.; SCHALM, O. W. **Schalm's veterinary hematology**.6 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010, 1206p.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v.124, p. 67–80, 1994.