

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**$\beta$ -GLUCANO E NUCLEOTÍDEOS PARA TAMBAQUIS  
(*Colossoma macropomum*) VACINADOS E DESAFIADOS COM  
*Aeromonas hydrophila*: DESEMPENHO PRODUTIVO E  
RESPOSTAS FISIOPATOLÓGICAS**

**EDSANDRA CAMPOS CHAGAS**

Engenheira de Pesca

Jaboticabal - São Paulo

Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**$\beta$ -GLUCANO E NUCLEOTÍDEOS PARA TAMBAQUIS  
(*Colossoma macropomum*) VACINADOS E DESAFIADOS COM  
*Aeromonas hydrophila*: DESEMPENHO PRODUTIVO E  
RESPOSTAS FISIOPATOLÓGICAS**

**Edsandra Campos Chagas**

**Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Jaboticabal - São Paulo

Fevereiro de 2010

C433b Chagas, Edsandra Campos  
β-glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossoma macropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila*: Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas / Edsandra Campos Chagas. -- Jaboticabal, 2010  
xiii, 141 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Flávio Ruas de Moraes

Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Cleni Mara Marzocchi Machado, Marco Antonio de Andrade Belo, Margarida Maria Barros

Bibliografia

1. *Colossoma macropomum*. 2. Imunoestimulantes-tambaqui. 3. Peixe-vacinação. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## DEDICO

Ao meu marido Manoel Luiz Neto, grande incentivador dessa conquista que me possibilitou crescimento pessoal e profissional, que foi meu braço direito em muitos momentos dessa tese, muitas das vezes adiando os seus objetivos para alcançar os meus, além de todo o suporte emocional e amor incondicional.

Às minhas filhas Emanuelle Caroline e Sophia Gabrielle por serem a realização de um sonho tão desejado e por transformarem a minha vida.

Ao pequeno "Luigi" que está para chegar e completar a minha felicidade.

Amo muito vocês!

## OFEREÇO

Ao meu pai, Edson Alencar, pelo exemplo maior de doação e dedicação à família, e pela lição de otimismo e superação em momentos extremos da vida quando nos falta principalmente saúde para trilharmos nossos caminhos. Esse "renascer" nos fez mais fortes e felizes.

À minha mãe Sandra Chagas e minha avó Floripes Calazans pelos exemplos de amor, humildade e doação ao próximo. Minha eterna admiração.

Aos meus irmãos Sheila, Steffen, Abraão e Andrezza por compartilharem comigo todas as alegrias e dificuldades dessa jornada e por serem presença constante em minha vida, tornando-a mais bela.

Aos meus sobrinhos Steffany, Raquel, Isaac e "Valentina" por serem as maiores alegrias de nossa família.

## AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela oportunidade do aprendizado.

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

À minha co-orientadora e grande amiga Dra. Fabiana Pilarski, pela transmissão de conhecimentos em microbiologia de peixes, pela dedicação nesse e em outros projetos realizados em conjunto e por partilhar momentos de muita felicidade.

Aos professores Cleni Mara Machado, Elisabeth Urbinati, Margarida Barros e Marco Antônio Belo pelas valiosas contribuições como banca de defesa deste trabalho.

À Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati pela amizade, por abrir as portas de seu laboratório para a realização das análises fisiológicas, pelas sugestões nos projetos conjuntos e pela transmissão de seus conhecimentos e sabedoria.

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Física e Química, por sua colaboração em disponibilizar materiais e equipamentos de seu laboratório para a realização das análises imunológicas.

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológica e Bromatológicas, pela amizade, incentivo, ensinamentos e auxílio nas análises imunológicas.

Ao Dr. Levy de Carvalho Gomes pela amizade e grande incentivo para a realização dessa tese.

Aos pesquisadores da área de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Cheila Boijink, Luis Inoue e Roger Crescêncio, pela amizade e ajuda durante a realização dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) e do Departamento de Patologia Veterinária - FCAV, Fabiana Pilarski, Daniela Nomura Varandas, Róberson Sakabe, José Dias Neto, Eduardo Criscuolo Urbinati, Fabiana Rizzi Bozzo, Gustavo Claudiano, Marina Keiko e Marcelo Castro pela amizade e apoio durante os experimentos e análises laboratoriais.

Aos amigos do Caunesp: Francine, Jaqueline, Janessa, Márcia Stech, Haluko, Missae, Silvinha, Damares, Seu Mauro, Valdecir, Júnior e Veralice, além de os todos estagiários pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao futuro Médico Veterinário Santiago de Pádua, pela amizade e toda ajuda no preparo e leituras das extensões sanguíneas.

À família Santana Ramiro, Simone, Daniel e Elisa, pela amizade, carinho e apoio, sendo presenças constantes em nossas vidas e por terem sido nossa família ao longo desses anos em Jaboticabal.

Às coordenadoras e professoras do Colégio Santo André, Marilena, Maria Rita, Maria das Dores, Maria Augusta, Eliana, Jacy, Jussara e Alcione, por todo o amor e carinho dedicado às minhas filhas e pela amizade.

Às Empresas Biorigin e ICC Indústria e Comércio Ltda pela doação dos imunoestimulantes utilizados nesse estudo.

À Embrapa e FAPESP (2007/53099-3) pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização dessa Tese.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>	
<b>CAPÍTULO I</b>		
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	09	
1. Tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	10	
2. O sistema imune dos peixes.....	12	
3. Nutrição e saúde dos peixes.....	18	
4. Imunoestimulantes.....	21	
5. Estresse em peixes.....	27	
6. Vacinação de peixes.....	29	
7. Referências Bibliográficas.....	35	
<b>Figura 1.</b> Exemplar de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	10	
<b>CAPÍTULO II</b>		
<b>DESEMPENHO PRODUTIVO, RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DESAFIO COM <i>Aeromonas hydrophila</i> EM JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>) ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM <math>\beta</math>- GLUCANO E NUCLEOTÍDEOS</b> .....		57
Resumo.....	58	
Abstract.....	59	
Introdução.....	60	
Material e métodos.....	61	
Resultados.....	67	
Discussão.....	76	
Referências.....	83	
<b>Tabela 1.</b> Composição percentual dos ingredientes e composição químico- bromatológica das dietas experimentais.....	63	
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros de desempenho produtivo de tambaquis criados durante 60 dias com dietas suplementadas com $\beta$ -glucano ou nucleotídeos.....	68	



<b>Tabela 3.</b> Mortalidade acumulada (%) de tambaquis suplementados com nucleotídeos na dieta por 60 dias, após desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	69
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros hematológicos de tambaquis após suplementação de $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias e 15 dias após o desafio bacteriano.....	71
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaquis após suplementação de nucleotídeos dieta por 60 dias e 15 dias após desafio bacteriano..	72
<b>Tabela 6.</b> Contagem diferencial de leucócitos de tambaquis após suplementação de $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias e 15 dias após desafio bacteriano.....	73
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros bioquímicos de tambaquis após suplementação de $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias e 15 dias após o desafio bacteriano.....	74
<b>Tabela 8.</b> Concentração e atividade de lisozima de juvenis de tambaquis alimentados com ração suplementada com $\beta$ -glucano na dieta antes e após o desafio bacteriano.....	75
<b>Figura 1.</b> Atividade respiratória de leucócitos de tambaquis após suplementação de nucleotídeos por 60 dias e desafio bacteriano.....	76

### CAPÍTULO III

#### RESPOSTAS DE ESTRESSE DE TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum*) ALIMENTADOS COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM $\beta$ -GLUCANO E NUCLEOTÍDEOS APÓS TRANSPORTE EM SISTEMA FECHADO.....

Resumo.....	94
Abstract.....	95
Introdução.....	96
Material e métodos.....	97
Resultados.....	100
Discussão.....	110
Referências.....	113

**Figura 1.** Cortisol plasmático e glicemia de tambaquis alimentados com  $\beta$ -glucano e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte)..... 101

**Figura 2.** Hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos de tambaquis alimentados com  $\beta$ -glucano e transportados por três horas em sistema fechado (AT

= antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte).....	102
<b>Figura 3.</b> Volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular média – HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM de tambaquis alimentados com $\beta$ -glucano e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte).....	104
<b>Figura 4.</b> Glicemia de tambaquis alimentados com nucleotídeos e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte).....	105
<b>Figura 5.</b> “Burst” oxidativo de tambaquis (densidade óptica, 540 nm) alimentados com nucleotídeos e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte).....	106
<b>Figura 6.</b> Hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos de tambaquis alimentados com nucleotídeos e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte).....	107
<b>Figura 7.</b> Volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular média – HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM de tambaquis alimentados com nucleotídeos e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte).....	109

#### **CAPÍTULO IV**

<b>EFICÁCIA DE UMA VACINA CONTRA <i>Aeromonas hydrophila</i> PARA JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>) SUPLEMENTADOS COM <math>\beta</math>-GLUCANO.....</b>	119
Resumo.....	120
Abstract.....	121
Introdução.....	122
Material e métodos.....	123
Resultados.....	127

Discussão.....	132
Referências .....	134
<b>Tabela 1.</b> Mortalidade de tambaquis, alimentados com ração suplementada com $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias, após vacinação e desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	127
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) de tambaquis alimentados com ração suplementada com $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias, após vacinação e desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	128
<b>Figura 1.</b> Exemplares de tambaqui apresentando sinais clínicos de ocorrência de <i>A. hydrophila</i> .....	128
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaquis, suplementados com $\beta$ -glucano na dieta, após vacinação e desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	130
<b>Figura 2.</b> Concentração de lisozima sérica de juvenis de tambaqui vacinados (PBS e vacina oleosa) e desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i> após alimentação suplementada com diferentes concentrações de $\beta$ -glucano por 60 dias.....	131
<b>Figura 3.</b> Atividade de lisozima sérica de juvenis de tambaqui vacinados (PBS e vacina oleosa) e desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i> após suplementação de $\beta$ -glucano em sua dieta por 60 dias.....	131
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	140

## RESUMO GERAL

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é a espécie de maior importância na piscicultura amazônica. Entretanto, a sua criação tem enfrentado problemas com relação a perdas provocadas pela instalação de doenças que surgem com a intensificação do cultivo. Por isso, o tambaqui foi escolhido como modelo experimental nesta tese. Inicialmente foi avaliado o emprego dos imunostimulantes  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui sobre o desempenho produtivo, respostas fisiológicas, imunológicas e resistência frente ao desafio com *Aeromonas hydrophila*, cujos resultados são apresentados no capítulo II. Os resultados deste estudo permitiram estabelecer que a suplementação de  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui não influenciam o desempenho produtivo; que o desafio bacteriano promoveu anemia normocítica-normocrômica ( $\beta$ -glucano) e anemia macrocítica-hipocrômica (nucleotídeos); que a suplementação de  $\beta$ -glucano não alterou a concentração e atividade de lisozima e a de nucleotídeos determinou redução na atividade respiratória de leucócitos, e que a menor suplementação dos imunostimulantes (0,1% de  $\beta$ -glucano e 0,2% de nucleotídeos) promoveu maior sobrevivência para a espécie após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. No capítulo III da tese avaliou-se as respostas fisiológicas de estresse de tambaquês alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos após transporte em sistema fechado. Os resultados deste estudo permitiram estabelecer que as alterações dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos (atividade respiratória de leucócitos) ocorreram imediatamente após o transporte, com retorno aos níveis basais após 24 e 48 horas de recuperação. Entretanto, a suplementação de  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos na dieta do tambaqui não foi eficiente em mitigar as respostas de estresse. Por último, avaliou-se o efeito adjuvante do  $\beta$ -glucano na eficácia de uma vacina oleosa contra *Aeromonas hydrophila* para juvenis de tambaqui com base nas respostas hematológicas, na concentração e atividade da lisozima e resistência após o desafio com a bactéria, como apresentado no capítulo IV. O resultado desta avaliação mostrou que o emprego de  $\beta$ -glucano na dieta não interferiu no efeito da vacina e que a vacina oleosa administrada intraperitonealmente foi efetiva na prevenção de aeromoniose em tambaqui.

Palavras-chave: Imunostimulantes, sistema imune não-específico, estresse, vacinação de peixes, *Aeromonas hydrophila*, tambaqui.

## ABSTRACT

The *Colossoma macropomum* is the most farmed species in the Amazon region. Therefore, disease has been a significant problem in tambaqui culture with overcrowding. Thus, the tambaqui was chosen as experimental model in this work. First it was to evaluate the use of the immunostimulants  $\beta$ -glucan and nucleotide in the tambaqui diet on the productive performance, physiological and immunological responses and resistance of *Aeromonas hydrophila* challenge exposed into chapter II. These results provide that the  $\beta$ -glucan and nucleotide dietary supplementation had no influence on the productive performance; that the bacterial challenge promoted normocytic-normochromic anemia ( $\beta$ -glucan) and macrocytic-hipocromic anemia (nucleotide); that the  $\beta$ -glucan supplementation did not change the lysozime concentration and activity; the nucleotide supplementation determinate the reduction of burst activity of leukocyte and the lowest concentrations of both immunoestimulants (0.1%  $\beta$ -glucan and 0.2% nucleotide) were effective to secure higher survival of tambaqui when challenged with *Aeromonas hydrophila*. After, was to evaluate the physiological stress response of tambaqui fed with  $\beta$ -glucan or nucleotide supplemented diet after transportation in closed system, exposed into chapter III. The results of this study demonstrated that the alteration in the hematological, biochemical and immunological (oxidative burst of leukocyte) occurred immediately after the transportation and returned to base levels after 24 and 48 hours to recover. However the  $\beta$ -glucan and nucleotide supplementation did not reduce the stress responses. In the last, the adjuvant effect of  $\beta$ -glucan in the efficiency of oil vaccine against *Aeromonas hydrophila* for tambaqui juveniles in the hematological responses, the concentration and activity of lysozime and resistance after the challenge with bacteria were evaluated into chapter IV. The results of this study showed that the  $\beta$ -glucan supplementation did not increase the vaccine effectiveness against *Aeromonas hydrophila* and the oil vaccine injected intraperitoneally was effective to prevent *Aeromonas* disease in tambaqui.

Key words: Immunostimulants, non-specific immune system, stress, vaccination of fishes, *Aeromonas hydrophila*, tambaqui.

## INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento da aquicultura mundial tem sido constante e estimulado pela crescente demanda por produtos de alta qualidade, alcançando 59,4 milhões de toneladas em 2004 (FAO, 2007). No Brasil, a produção aquícola e pesqueira alcançou, no ano de 2004, volume de 1.015.916 toneladas, o que representou acréscimo de 2,6% em comparação ao ano de 2003. A aquicultura participou com 26,5% (269.697,50 toneladas) da produção total e gerou receita de US\$ 965.627,60 (FAO, 2006).

A criação de espécies nativas vem crescendo nos últimos anos e, no caso do tambaqui (*Colossoma macropomum*), sua criação tem se expandido nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (IBAMA, 2005). A expansão da criação dessa espécie é atribuída ao seu excelente potencial para produção intensiva, principalmente pela fácil obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e excelente utilização de alimentos (Saint-Paul, 1986; Val et al., 1998; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Melo et al., 2001; Araújo-Lima & Gomes, 2005). É a espécie mais criada na região Norte do Brasil (IBAMA, 2005), alcançando 3,0 kg de peso em 12 meses de criação em sistemas de viveiros/barragens (Melo et al., 2001; Araújo-Lima & Gomes, 2005).

Um dos principais problemas relacionados à criação do tambaqui é a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Malta et al., 2001; Silva, 2001). Com relação aos patógenos oportunistas de peixes de água doce, a bactéria *Aeromonas hydrophila* é um dos mais importantes, causando quadros de septicemia hemorrágica. Dentre as lesões da aeromoniose incluem-se petéquias localizadas em toda a superfície corporal, úlceras, exoftalmia, distensão abdominal por ascite, além de anemia (Merino et al., 1995; Austin & Austin, 1999; Kirov et al., 2002), sendo este patógeno um dos maiores problemas na criação de peixes de água doce.

Nos sistemas de criação intensiva, os peixes são expostos continuamente a alterações na qualidade da água e a práticas de manejo, tais como: manuseio excessivo, transporte e adensamento, que induzem respostas de estresse, com consequências negativas sobre o desempenho produtivo, resposta imune e resistência dos peixes a patógenos (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2000; Barton et al., 2000; Brandão et al., 2006). Nestes sistemas, a nutrição tem importante papel na manutenção do crescimento normal e da saúde dos organismos aquáticos.

Os antibióticos são utilizados para o tratamento de doenças na aquicultura. Contudo, o uso dessas drogas ocasiona problemas como o desenvolvimento de bactérias resistentes e a presença de resíduos de antibióticos nos tecidos de peixes comercializados (Buchman et al., 1992; Grant & Briggs, 1998; Smith et al., 2003; Sorum, 2006). Assim, muitos pesquisadores enfatizam o emprego das boas práticas de manejo (BPMs) (Boyd & Queiroz, 2004), com o uso de imunoestimulantes (Sakai, 1999; Li & Gatlin III, 2006; Dalmo & Bogwald, 2008).

Os imunoestimulantes são considerados substâncias biológicas que auxiliam benéficamente os mecanismos específicos e não específicos de defesa dos animais (Verlhac et al., 1998; Raa, 2000; Vainikka et al., 2005; Chagas et al., 2009; Moraes & Moraes, 2009). O emprego dessas substâncias na dieta dos peixes favorece as respostas orgânicas de defesa frente às infecções (Erdal et al., 1991; Verlhac et al., 1998; Sakai, 1999; Raa, 2000; Amar et al., 2001; Vainikka et al., 2005). Portanto, a melhora na condição imune do organismo por manipulação dietética representa alternativa ao uso de drogas na aquicultura (Verschuere et al., 2000).

Os imunoestimulantes são agrupados em fatores nutricionais como as vitaminas, substâncias derivadas de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, além de substâncias químicas sintéticas (Sakai, 1999; Cook et al., 2003; Smith et al., 2003; Vainikka et al., 2005; Li & Gatlin III, 2006). Dentre os compostos com características imunoestimulantes destacam-se os glucanos e os nucleotídeos.

Os  $\beta$ -glucanos são macromoléculas formadas por blocos de glicose unidos por meio de ligações  $\beta$  (1-3) e  $\beta$  (1-6), sendo normalmente encontrados nas células de levedura e fungos e funcionam como imunoestimulante em mamíferos (DiLuzio, 1985) e em peixes (Robertsen et al., 1990; Cook et al., 2003). Existem evidências que o mecanismo de ação do  $\beta$ -glucano se dá por meio de receptores específicos localizados na superfície dos macrófagos (Jorgensen & Robertsen, 1995), sendo este fato observado “in vitro” em macrófagos de salmão do Atlântico (Engstad & Robertsen, 1993). Nos peixes, o  $\beta$ -glucano pode favorecer a estimulação dos mecanismos de defesa não-específicos, estimulando a atividade fagocitária dos macrófagos e aumentando assim sua capacidade para eliminar os patógenos (Jorgensen et al., 1993; Jorgensen & Robertsen, 1995; Cook et al., 2003). O  $\beta$ -glucano é responsável também por incrementar a produção de proteínas líticas como a lisozima e as do sistema complemento (Engstad et al., 1992; Paulsen et al., 2001).

Os nucleotídeos têm funções fisiológicas e bioquímicas essenciais incluindo codificação e decodificação da informação genética, mediando o metabolismo energético e atuando como componentes de coenzimas, efetores alostéricos e agonistas celulares (Carver

& Walker, 1995; Cosgrove, 1998). A deficiência desse nutriente pode prejudicar as funções do fígado, coração, intestino e imune (Grimble & Westwood, 2000). Por outro lado, a suplementação de nucleotídeos na dieta dos peixes tem influenciado as respostas imunes e aumentado a resistência às doenças (Burrels et al., 2001; Leonardi et al., 2003; Low et al., 2003). Em salmonídeos, essa suplementação aumentou a resistência dos peixes contra infecções virais, bacterianas e parasitárias, e ainda melhorou a eficácia da vacinação e a capacidade osmorregulatória (Burrels et al., 2001).

As misturas comerciais de glucano e nucleotídeos apresentam efeito benéfico sobre o desempenho produtivo, principalmente quanto ao aumento da taxa de crescimento de espécies de peixes (Ramadan & Atef, 1991; Adamek et al., 1996; Cook et al., 2003; Misra et al., 2006; Ai et al., 2007; Sealey et al., 2008; Dalmo & Bogwald, 2008). Contudo, pesquisas sobre concentração e regime de administração para suplementos a base de glucanos e nucleotídeos em peixes nativos brasileiros são limitadas. Portanto, o estabelecimento de métodos de imunostimulação que melhorem o desempenho produtivo, a resistência ao estresse e as condições de saúde dos peixes, contribuindo para prevenir a ocorrência de doenças na criação, são etapas primordiais para o desenvolvimento da atividade.

A presente tese foi estruturada em cinco capítulos. Esta introdução contextualiza a temática do estudo. A parte seguinte, o primeiro capítulo denominado Considerações Iniciais, apresenta as concepções teóricas que embasam o estudo, contextualizando o estado da arte da criação do tambaqui, o sistema imune dos peixes, o processo inflamatório, aspectos da nutrição e saúde dos peixes, os imunostimulantes, o estresse e a vacinação na criação de peixes. Apresenta também o objetivo do projeto que foi avaliar a eficácia dos imunostimulantes  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui (*Colossoma macropomum*) com base no desempenho produtivo e resistência frente ao desafio bacteriano, nas respostas fisiológicas de estresse e na eficácia de uma vacina contra *Aeromonas hydrophila*. O capítulo II apresenta o desempenho produtivo, respostas fisiológicas e desafio com *Aeromonas hydrophila* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos. O capítulo III apresenta as respostas de estresse de tambaquês (*Colossoma macropomum*) alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos após transporte em sistema fechado. O capítulo IV apresenta a eficácia de uma vacina contra *Aeromonas hydrophila* para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) suplementados com  $\beta$ -glucano e o capítulo V apresenta as considerações finais com as implicações do estudo e as perspectivas futuras.



## Referências

- ADAMEK, Z.; HAMACKOVA, J.; KOURIL, J.; VACHTA, R.; STIBRANYIOVA, I. Effect of ascogen probiotics supplementation on farming success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and wells (*Silurids glais*) under conditions of intensive culture. **Krmiva (Zagreb)**, v. 38, p. 11-20, 1996.
- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394-402, 2007.
- AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 32, p. 162-173, 2001.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 175-202.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 1998. 186 p.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Chichester: Springer Praxis, 3<sup>rd</sup> Edition. 1999. 459p.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, p. 12-18, 2000.
- BARTON, B. A.; BOLLING, H.; HAUSKINS, B.; JANSEN, C. R. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns* x *S. platyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126A, p. 125-134, 2000.
- BOYD, C. E.; QUEIROZ, J. F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Ed. TecArt, 2004. p. 25-44.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazônica**, v. 36, p. 349-356, 2006.

- BUCHMANN, K.; ROEPSTORFF, A.; WALLER, P.J. Experimental selection of mebendazole-resistant gill monogeneans from the european eel, *Anguilla-Anguilla* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 15, p. 393-400, 1992.
- BURRELS, C.; WILLIAM, P. D.; FORNO, P. F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. **Aquaculture**, v. 199, p. 159-169, 2001.
- CARVER, J. D.; WALKER, W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, p. 58-72, 1995.
- CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T.E.H.P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 132-225.
- COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAAK, B. F.; HAYBALL, J. D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, p. 333-345, 2003.
- COSGROVE, M. Nucleotides. **Nutrition**, v. 14, p. 748-751, 1998.
- DALMO, R. A.; BOGWALD, J.  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p. 384-396, 2008.
- DILUZIO, N. R. Update on the immunomodulating activities of glucans. **Springer Seminar Immunopathology**, v. 88, p. 387-400, 1985.
- ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 17, p. 319-330, 1993.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, E.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, p. 287-297, 1992.
- ERDAL, J.I., EVENSEN, O., KAURSTAD, O.K., ILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. **Aquaculture**, v. 98, p. 363-379, 1991.

FAO. **Status of world aquaculture 2006**. FAO. Roma, 2006. (FAO Fisheries Technical Paper, 500).

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006**. FAO. Roma, 2007, p.198.

GRANT, A.; BRIGGS, A. D. Use of ivermectin in marine fish farms: some concerns. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, p. 566-568, 1998.

GRIMBLE, G. K.; WESTWOOD, O. M. R. Nucleotides. In: GERMAN, J. B.; KEEN, C. L. (Ed.). **Nutrition and Immunology: Principles and practice**. Totowa, NJ, USA, Humana Press Inc., 2000. p. 135-144.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Produção brasileira da Aqüicultura Continental, por Estado e espécie, para o ano de 2005**: Estatística da Aqüicultura e Pesca no Brasil – Ano 2005. Brasília: SEAP, 2005. 101 p.

JORGENSEN, J. B.; ROBERTSEN, B. Yeast  $\beta$ -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 43-57, 1995.

JORGENSEN, J.B.; SHARP, J.E.; SECOMBES, C.J.; ROBERSEN, B. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, p. 267-277, 1993.

KIROV, S.M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.T.; ODO NOVAN, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 547-555, 2002.

LEONARDI, M.; SANDINO, A. M.; KLEMPAU, A. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 23, p. 52-59, 2003.

LI, P.; GATLIN III, D. M. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v. 251, p. 141-152, 2006.

LOW, C.; WADSWORTH, S.; BURRELS, C.; SECOMBES, C. J. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. **Aquaculture**, v. 221, p. 23-40, 2003.

MALTA, J.C.O.; GOMES, A.L.S.; ANDRADE, S.M.S.; VARELLA, A.M.B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* GOLVAN, 1956,

(EOACANTHOCEPHALA, NEOECHINORHYNCHIDAE) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001.

MELO, L.A.S.; IZEL, A.C.U.; RODRIGUES, F.M. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas**. Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 25p.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 157-168, 1995.

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

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 625-723.

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

RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: CRUZ -SUÁREZ, L.E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., OLVERA-NOVOA, M.A.; CIVERA-CERECEDO, R. (Eds.). **Avances en Nutrición Acuicola V**. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Mérida, Yucatán, Mexico, 2000.

RAMADAN, A.; ATEF, M. Effect of the biogenic performance enhancer (Ascogen “S”) on growth rate of tilapia fish. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 87, p. 304-306, 1991.

ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, p. 391-400, 1990.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American fresh water fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.

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

SEALEY, W. M.; BARROWS, F. T.; HANG, A.; JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K.; LAPATRA, S. E.; HARDY, R. W. Evaluation of the ability of barley genotypes containing

- different amounts of  $\beta$ -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 115-28, 2008.
- SILVA, C.M.A. **Bactérias gram-negativas isoladas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas-Brasil**. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 71-90, 2003.
- SORUM, H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: AARESTRUP, F.M. (Ed.). **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. Washigton DC: ASM Press, 2006. p. 213-238.
- VAINIKKA, A.; JOKINEN, E. I.; KORTET, R.; PAUKKU, S.; PIRHONEN, J.; RANTALA, M. J.; TASKINEN, J. Effects of testosterone and  $\beta$ -glucan on immune functions in tench. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 348-361, 2005.
- VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, v. 33, p. 107-114, 1998.
- VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHÜEP, W.; SOLE, R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 409-24, 1998.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655-671, 2000.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77(3), p. 591-625, 1997.

## **CAPÍTULO I**

### **Considerações Iniciais**

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1. Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818), conhecido vulgarmente como tambaqui (Figura 1), é um peixe da ordem Characiformes, pertencente à família Serrasalminidae (Gery, 1977) e nativo dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes. O tambaqui alcança porte máximo em torno de 100 cm de comprimento e peso superior a 30 kg, atingindo maturidade sexual entre o 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> ano de vida. Em cativeiro, esta espécie atinge a maturação sexual em até três anos (Goulding & Carvalho, 1982; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Araújo-Lima & Gomes, 2005).



**Figura 1.** Exemplar de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

O comportamento alimentar da espécie varia ontogeneticamente de zooplantófago para onívoro, com tendência a frugívoro (Honda, 1974; Carvalho, 1981; Araújo-Lima & Gomes, 2005). Frutos e sementes são alguns dos alimentos disponíveis para o tambaqui em seu ambiente natural, tais como embaúba (*Cecropia* sp.), munguba (*Pseudobombax munguba*), seringa barriguda (*Hevea spruceana*), jauari (*Astrocaryum jauari*) entre outras. Porém, as variações sazonais no nível das águas é o principal fator que influencia a disponibilidade destes itens alimentares (Honda, 1974; Smith, 1979; Goulding, 1980; Silva, 1996; Araújo-Lima & Gomes, 2005). Em ambiente de criação, o tambaqui aceita bem ração, grãos e co-produtos agro-industriais (Araújo-Lima & Gomes, 2005).

O tambaqui é resistente à hipóxia (Saint-Paul, 1984). Em ambientes hipóxicos, quando a concentração de oxigênio diminui para 0,5 mg O<sub>2</sub>/L, o tambaqui apresenta o desenvolvimento do lábio inferior em cerca de duas horas. Por outro lado, quando a concentração de oxigênio volta aos seus níveis normais no ambiente, o lábio regride no mesmo intervalo de tempo (Saint-Paul, 1984; Val & Almeida-Val, 1995; Val et al., 1998). Esta adaptação morfo-anatômica tem como função direcionar a camada superficial da água mais oxigenada para a região das brânquias (Braun & Junk, 1982; Saint-Paul, 1984). Outras

estratégias para aumentar a eficiência na transferência de oxigênio do ambiente para os tecidos incluem modificações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas (Val & Almeida-Val, 1995; Val et al., 1998).

A criação do tambaqui tem se expandido nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (IBAMA, 2005) e isso têm sido atribuído ao seu excelente potencial para produção intensiva, principalmente pela fácil obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e boa conversão alimentar (Saint-Paul, 1986; Val et al., 1998; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Melo et al., 2001; Araújo-Lima & Gomes, 2005). É a espécie mais criada na região Norte do Brasil (IBAMA, 2005).

O pacote de produção do tambaqui em viveiros/barragens, lançado pela Embrapa Amazônia Ocidental, tem apresentado ótimos resultados na região Norte do Brasil (Melo et al., 2001; Izel & Melo, 2004). Esse pacote é dividido em duas fases: recria (60 dias) e engorda (240-300 dias). Os resultados da engorda do tambaqui mostram que a espécie alcança 3,0 kg de peso em 12 meses de criação em sistemas de viveiros/barragens, com produção de 10.075 kg/ha (Melo et al., 2001; Izel & Melo, 2004), sendo sua criação considerada lucrativa, com rentabilidade que varia de 19 a 40% (Melo et al., 2001).

A criação de peixes em tanques-rede vem crescendo no Brasil devido ao menor custo de investimento, tecnologia disponível e disponibilidade de águas represadas no país (Beveridge, 1996; Ayroza et al., 2006; Gomes et al., 2006). O tambaqui apresenta boa adaptação em tanques-rede de pequeno volume durante a fase de recria (Brandão et al., 2004), podendo a sua criação ser realizada em tanques-rede com volumes de 1 e 6m<sup>3</sup>, baseado nos dados de produtividade, sem prejuízo zootécnico para o criador (Gomes et al., 2004). Para a recria do tambaqui em tanques-rede, a densidade de 400 peixes/m<sup>3</sup> é a mais adequada (Brandão et al., 2004) e a estratégia alimentar mais eficiente para esta fase de criação é oferecer 10% da biomassa dividida em três refeições diárias (Silva et al., 2007).

Na fase de engorda em tanques-rede em lago de várzea da Amazônia Central, o tambaqui alcança alta produtividade (Chagas et al., 2003a; Gomes et al., 2006), podendo atingir 950 g em 240 dias de criação, com conversão alimentar de 1,8 e produção de 46,8 kg ha<sup>-1</sup> (Gomes et al., 2006). No início da engorda, o fornecimento de ração na taxa de 5% do peso vivo/dia permite o desempenho satisfatório da espécie (Chagas et al., 2005).

Um dos principais problemas relacionados à criação de tambaqui é a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas (Araújo Lima & Goulding, 1998; Malta et al., 2001, Silva,



2001). Segundo Malta et al. (2001), as doenças parasitárias mais comumente relatadas para o tambaqui são causadas por monogenóides, acantocéfalos, *Myxobolus* sp., copépodos, branquiúros e fungos. Com relação às doenças bacterianas, Silva (2001) registrou a ocorrência de 22 espécies de bactérias na criação de tambaquis, cujas espécies mais representativas encontradas nas brânquias foram: *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Moraxella* sp., *Pasteurella* sp., *Rochalimaea henselae*, *Xenorhabdus* sp., *Enterobacter* sp., *Yersinia* sp., *Actinobacillus* sp., *Haemophilus* sp., *Proteus* sp., *Cardiobacterium* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Hafnia* sp., *Providencia* sp. e *Pseudomonas* sp. Contudo, na criação de peixes de água doce parte da mortalidade registrada é causada por *Aeromonas hydrophila* (Belém-Costa & Cyrino, 2006).

O estabelecimento de métodos que melhorem as condições de saúde dos peixes cultivados (Wedemeyer, 1996) e contribuam para prevenir a ocorrência de doenças é primordial para o desenvolvimento da atividade.

## **2. O sistema imune dos peixes**

O sistema imune dos peixes é dividido em dois componentes primários: inato (não específico) e adaptativo (específico). Como em outros vertebrados, o sistema imune inato ou não específico dos peixes fornece a primeira linha de defesa imune. Este consiste de barreiras físicas que incluem escamas, muco, brânquias e epiderme, imunócitos incluindo as células fagocíticas, células citotóxicas não-específicas, células endoteliais e ampla variedade de componentes humorais tais como transferrina, lisozima, sistema complemento, inibidores de protease, anticorpos naturais, lecitinas, pentraxinas, citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos da secreção interna de vários tecidos e tipos de células (Magnadóttir, 2006). A resposta inata consiste em impedir que os agentes patogênicos tenham acesso ao organismo hospedeiro, podendo eliminá-los e/ou bloquear sua entrada (Bernstein et al., 1998). No primeiro contato do patógeno com o hospedeiro, são acionados mecanismos inatos que são suficientes para prevenir a infecção. Neste momento, os mecanismos de defesa específicos também são acionados para produzir a memória imunológica, bloqueando o desenvolvimento de nova infecção (Verlhac & Gabaudan, 1997).

As respostas imunes adaptativas ou específicas são dependentes da atividade dos linfócitos B e T, que atuam na produção de imunoglobulina específica, atividade citotóxica e imunomodulação via citocinas (Shoemaker et al., 2001), que contribuem para resposta mais eficiente contra a infecção (McGuinness et al., 2003; Medzhitov, 2007). Entretanto, existem

evidências sobre a integração de diferentes mecanismos imunes em cadeia multinível, a qual desafia a dicotomia artificial entre o sistema inato e adaptativo (Flajnik & Du Pasquier, 2004).

A caracterização dos mecanismos e vias do sistema immune dos peixes tem obtido grande progresso. Entretanto, ainda existem importantes lacunas no conhecimento de numerosos mecanismos imunes, além da disponibilidade de informações poderem variar de acordo com a espécie de peixe (Alvarez-Pellitero, 2008). Recentemente, iniciaram-se os estudos sobre a imunologia dos peixes nativos como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon amazonicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Abreu, 2007; Biller, 2008; Oliveira, 2008; Chagas et al., 2009). Contudo, a maioria dos estudos sobre imunologia de peixes, incluindo os realizados com as espécies nativas, tem sido relacionada somente a imunidade inata ou não específica (Secombes, 1996; Dalmo et al., 1997; Magnadóttir, 2006; Zapata et al., 2006; Whyte, 2007; Alvarez-Pellitero, 2008).

### **2.1. Células do sistema imune dos peixes**

Os diferentes tipos de leucócitos conhecidos em mamíferos também são descritos em peixes teleósteos, incluindo células que são morfológica e funcionalmente equivalentes a dos mamíferos, tais como: neutrófilos, monócitos, células B, plasmócitos, células T, células “natural killer” e eosinófilos (Secombes, 1996; Whyte, 2007; Alvarez-Pellitero, 2008). Alguns estudos recentes confirmam o papel de certos leucócitos como “células apresentadoras de antígenos” ou células dendríticas (Cuesta et al., 2006, Araki et al., 2008; Alvarez-Pellitero, 2008).

Os teleósteos não possuem medula óssea ou linfonodos. A mielopoiese geralmente ocorre no rim anterior e/ou baço, considerando que o timo, rim e baço são os principais órgãos linfóides (Zapata et al., 2006). O rim anterior é considerado o órgão primário de células B, exibindo similaridades morfológicas com a medula óssea de vertebrados superiores, servindo também como um órgão linfóide secundário (análogo ao linfonodo) e no “clearance” de antígenos solúveis e particulados da circulação, sendo este o principal local de produção de anticorpos (Whyte, 2007).

O baço dos teleósteos também está incluído na eliminação de antígenos transportados pelo sangue e complexos imunes em elipsóides vasos sanguíneos, e também tem papel na apresentação de antígenos e na iniciação da resposta imune adaptativa (Whyte, 2007). O rim anterior e o baço apresentam agregados de macrófagos, também conhecidos como centros de melano-macrófagos, os quais também se desenvolvem em associação com lesões inflamatórias crônicas em outros órgãos. Nos teleósteos superiores, eles geralmente existem

como complexo de centros discretos, contendo linfócitos e macrófagos (Agius & Roberts, 2003).

O timo, órgão linfóide primário e sítio principal de desenvolvimento de células T em mamíferos, é pouco conhecido em teleósteos. O timo pode ser considerado como agregação de encapsulados de macrófagos que processa a proliferação de células T (Alvarez-Pellitero, 2008).

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) de teleósteos é constituído principalmente por diferentes tamanhos de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, assim como por vários tipos de granulócitos, células PAS positivas e eosinófilos granulares (Zapata & Amemiya, 2000). Em teleósteos, os linfócitos intraepitelial do intestino são considerados como células T, considerando que as células linfóides na lâmina são principalmente linfócitos B (Zapata et al., 2006).

## **2.2. Mucosa epitelial**

Os receptores envolvidos na resposta da mucosa epitelial são receptores tipo “Toll” e “NODs” (domínio de oligomerização de nucleotídeo) (Medzhitov, 2007). O reconhecimento do patógeno ocorre não somente por meio de “células especializadas apresentadoras de antígenos”, mas também pelas células epiteliais que constituem a barreira celular primária (Fritz et al., 2007). Dois tipos de células podem ativar o sinal correspondente que conduz a diferentes mecanismos e vias (fagocitose, complemento, reação de fase aguda e ativação de citocinas), de maneira que a resposta epitelial é finalmente integrada com a resposta imune completa. A relação entre célula epitelial e célula T tem importante papel na regulação imune do intestino (Shao et al., 2001).

A mucosa epitelial tem importante papel na imunologia de peixes. Quando o parasito encontra o hospedeiro, ele deve vencer a primeira barreira constituída pela pele e tegumento. O muco não somente age como barreira, mas contém vários componentes relevantes na interação parasito-hospedeiro. Imunoglobulinas, complemento, proteínas C-reativas, lecitinas, lisozima, enzimas proteolíticas, fosfatase alcalina e esterase, peptídeos antimicrobianos e hemolisina estão entre as substâncias presentes com atividades biostáticas ou biocidas (Jones, 2001; Palaksha et al., 2008).

## **2.3. Função imune**

Embora praticamente todos os tipos de leucócitos contribuam para a defesa do hospedeiro, três tipos desempenham papéis especialmente importantes. Dois deles (os

neutrófilos e a série de monócitos-macrófagos) são células fagocíticas, que atuam primariamente ingerindo e digerindo bactérias, restos celulares e outros materiais particulados. O terceiro grupo, formado pelos linfócitos e células relacionadas, possui pouca capacidade fagocítica, mas realiza várias outras reações protetoras, coletivamente conhecidas como respostas imunológicas (Parslow & Bainton, 2004).

Os fagócitos são as células mais importantes do mecanismo celular não-específico e são auxiliadas por vários fatores solúveis tais como complemento e lisozima. Os peixes alimentados com imunoestimulantes em suas dietas demonstram aumento da fagocitose e da atividade respiratória (Sakai et al., 2001; Selvaraj et al., 2006; Ai et al., 2007; Lin et al., 2009; Siwicki et al., 2009). Estas são afetadas por vários fatores como nutrientes, temperatura e patógenos (Maita, 2007). As células fagocíticas dos peixes são capazes de engolfar a bactéria e matá-la pela geração de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e seus derivados tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais livres ( $OH^{\cdot}$ ) num processo conhecido como “burst” respiratório. Estes intermediários reativos ao oxigênio possuem potente atividade bactericida (Sakai et al., 2001; Selvaraj et al., 2006; Ai et al., 2007; Maita, 2007; Lin et al., 2009; Siwicki et al., 2009).

A lisozima é importante agente bacteriolítico encontrada em várias espécies de peixes marinhos e de água doce (Lie et al., 1989; Balfry & Iwama, 2004). Os leucócitos tais como monócitos, macrófagos e granulócitos polimorfonucleares são conhecidos por sintetizarem e secretarem lisozima em peixes (Murray & Fletcher, 1976). O tecido do rim parece ter a maior concentração de lisozima, provavelmente devido a alta concentração destes leucócitos na porção hematopoética anterior do rim. A lisozima também é detectada em outros tecidos de peixes tais como baço, fígado, pele, muco, brânquias, músculo, ovário e ovos (Takahashi et al., 1986; Lie et al., 1989; Yousif et al., 1991; Takemura & Takano, 1995). O aumento no nível desta enzima é considerado mecanismo de proteção natural nos peixes (Ingram, 1980). A lisozima isolada dos peixes é efetiva como agente bacteriolítico contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos de peixes (Grinde, 1989; Yousif et al., 1994), principalmente por ser encontrada em áreas que estão em frequente contato com o patógeno (rim e muco) (Ellis, 1990).

Paulsen et al. (2003) demonstraram que  $\beta$ -glucanos são capazes de induzir o aumento da atividade de lisozima no plasma pela estimulação da transcrição da lisozima no rim anterior, baço, fígado e intestino. Os imunoestimulantes podem induzir a transcrição da lisozima em várias células diretamente pela combinação de receptores ou indiretamente por indução de citocinas. Como os macrófagos são as mais prováveis células primárias secretoras de lisozima em peixes, o rim anterior é provavelmente o principal órgão secretor de lisozima.

O sistema complemento reúne aproximadamente 30 proteínas séricas e de membrana, que interagem numa sequência determinada gerando funções efetoras de resposta imune humoral e celular (Kinoshita, 1991). Este sistema pode ser ativado por três vias distintas, denominadas vias clássica, alternativa e a da lectina (Janeway et al., 1997; Holland & Lambris, 2002). As atividades biológicas importantes decorrentes da ativação do complemento são participação na fagocitose, inibição da formação de imunocomplexos e a solubilização de imunocomplexos pré-formados, a eliminação de imunocomplexos, a lise celular, e a participação no processo inflamatório e na resposta imune.

Nos peixes, a atividade do sistema complemento pela via alternativa é alta quando comparada aos mamíferos (Yano, 1996), sugerindo a importância desta via como mecanismo de defesa do peixe (Ellis, 2001). Alguns compostos com características imunoestimulantes, tais como lipídios, vitaminas C e E, carotenóides, glucanos e nucleotídeos estão envolvidos na modulação da atividade do sistema complemento em peixes (Sakai et al., 2001; Pearce et al., 2003; Amar et al., 2004; Lin & Shiau, 2005).

#### **2.4. Inflamação**

A inflamação é um mecanismo normal de defesa do hospedeiro que o protege de agressões físicas, químicas e biológicas. Esse mecanismo serve para destruir, diluir ou imobilizar o agente agressor, além de iniciar o processo de reparação do tecido lesado e ajuda a restabelecer a homeostase em áreas infectadas ou injuriadas (Garcia-Leme, 1989). Ela é caracterizada pelo calor, rubor, tumor, dor e perda de função, e envolve interações entre vários tipos de células e a produção de mediadores químicos (Terr, 2004; Robbins & Cotran, 2005).

O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é uma das características principais do processo inflamatório, com a mobilização de leucócitos, de forma adequada e em tempo hábil, da microcirculação para o foco inflamado, sendo esta a primeira ação de defesa do organismo (Moraes & Moraes, 2009).

A inflamação divide-se em aguda e crônica. A reação inflamatória aguda é de curta duração, o que varia de alguns minutos até um ou dois dias, e suas principais características são vasodilatação arteriolar, capilar e venular; aumento da permeabilidade vascular acompanhada da formação de edema; aumento da viscosidade sanguínea e marginação leucocitária; diapedese; quimiotaxia; acúmulo de leucócitos, particularmente neutrófilos, no foco lesado e fagocitose (Garcia-Leme, 1989; Robbins & Cotran, 2005; Moraes & Moraes, 2009). Contudo, quando a resposta inflamatória aguda não é suficiente para eliminar o agente

patogênico, esta pode tornar-se crônica e contribuir para a perpetuação e progressão da doença (Robbins & Cotran, 2005; Moraes & Moraes, 2009).

Ensaio de inflamação aguda realizados com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas suplementadas com as vitaminas C e E (500 mg kg<sup>-1</sup> de ambas as vitaminas) por 30 dias mostraram aumento no número de células no foco inflamatório, quando comparados aos não suplementados, após injeções de carragenina e LPS. A suplementação vitamínica promoveu maior acúmulo de células de defesa (leucócitos e trombócitos) na bexiga natatória após o estímulo inflamatório, ressaltando os efeitos benéficos da suplementação vitamínica para o sistema imune dos peixes (Martins et al., 2008).

A inflamação crônica possui maior duração que a aguda, e nesta há a presença de infiltrados de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos; destruição tecidual induzida pela persistência do agente nocivo ou pelas células inflamatórias; substituição do tecido danificado por tecido conectivo, efetuado por meio da proliferação de pequenos vasos sanguíneos e, em particular, fibrose (Robbins & Cotran, 2005; Moraes & Moraes, 2009). Outros tipos celulares presentes na inflamação crônica são os linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos (Robbins & Cotran, 2005). Contudo, há padrão distinto de reação inflamatória crônica descrita como inflamação granulomatosa. Esta é caracterizada pelo acúmulo focal de macrófagos, a qual pode dividir-se quanto ao seu tipo em granulomas de corpo estranho e imunes (Robbins & Cotran, 2005; Moraes & Moraes, 2009).

O granuloma é um foco de inflamação crônica com agregados microscópicos de macrófagos, cercados por um colar de leucócitos mononucleares, especialmente linfócitos e ocasionalmente, plasmócitos. Essas células gigantes podem conter grande quantidade de citoplasma com 20 ou mais pequenos núcleos na periferia (célula gigante de Langhans) ou distribuídos ao acaso (célula gigante do tipo corpo estranho). Contudo, não há diferenças funcionais entre esses tipos de células gigantes (Robbins & Cotran, 2005; Moraes & Moraes, 2009).

Em tilápias do Nilo, Belo (2006) avaliou o recrutamento de macrófagos e a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo dos peixes e observou maior acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em peixes suplementados com vitamina E (500 mg/kg de ração) e vacinados com bacterinas de *Mycobacterium marinum*. Em outro estudo, a suplementação da dieta de tilápia do Nilo com fontes de ácidos graxos essenciais n-6 (OS) e n-3 (OL) incrementou a resposta inflamatória crônica pelo

acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos, células de Langhans nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo (Sakabe, 2007).

### **3. Nutrição e Saúde dos Peixes**

Na nutrição de peixes, muitos benefícios no crescimento, eficiência alimentar e sobrevivência para várias espécies cultivadas são alcançados em função do estabelecimento de suas exigências nutricionais. Recentemente, o foco dessas pesquisas expandiu-se, considerando também o efeito desses nutrientes sobre a saúde dos peixes.

As dietas artificiais constituem a principal fonte de nutrientes essenciais para os peixes em sistemas de criação intensiva. As exigências de nutrientes essenciais (proteínas, lipídios, minerais e vitaminas) variam em função de diversos fatores, entre eles a demanda metabólica (resposta de estresse, resistência a enfermidades, entre outras) (Blom & Dabrowski, 1995; Gouillou-Coustans et al., 1998). Níveis superiores aos estabelecidos para se alcançar máximo crescimento e utilização do alimento são utilizados para maximizar as concentrações corporais e atender as funções fisiológicas dos peixes (Li & Robinson, 1999; Gatlin III, 2002; Maita, 2007), quando em situações de estresse, desafio com patógenos ou condições ambientais desfavoráveis. Nesse sentido, o uso de alimentos funcionais, que atuam na manutenção do equilíbrio orgânico dos animais frente à condições adversas inerentes à criação intensiva, desponta como alternativa promissora para a aquicultura.

Para manutenção da saúde em peixes cultivados, estratégia que pode ser adotada é a administração de imunostimulantes em suas dietas (Maita, 2007) com o objetivo de estimular os mecanismos não específicos de defesa nos peixes (Sakai, 1999). A adoção dos protocolos de imunostimulação para peixes permitirá maximizar a sua proteção em situações de estresse, evitando o estabelecimento de doenças na criação, contribuindo para melhorar o desempenho zootécnico e sobrevivência dos peixes, o que conseqüentemente reduzirá as perdas econômicas no processo produtivo.

As análises hematológicas são utilizadas largamente na avaliação do estado de saúde de peixes, detectando mudanças fisiológicas ocorridas após exposição a diferentes condições estressantes, tais como: alterações na qualidade da água (Brandão et al., 2006; Aride et al., 2007), práticas de manejo (Brandão et al., 2006; Gomes et al., 2006), doenças (Garcia et al., 2007; Tavares-Dias et al., 2007; 2008), hipóxia ambiental (Val & Almeida-Val, 1995; Marcon et al., 1999; Chagas & Val, 2006; Baldisseroto et al., 2008), além da exposição a metais (Duarte et al., 2009). Os parâmetros hematológicos tais como hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina (Hb) e número de eritrócitos (RBC) são utilizados na avaliação das

exigências por certos micronutrientes da dieta (Chagas & Val, 2003), assim como na determinação da qualidade do alimento e estratégia de alimentação (Maita, 2007). As constantes corpusculares [volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)], junto com a morfologia dos eritrócitos, podem fornecer informação complementar, ajudando também na caracterização de anemias (Maita, 2007).

Vários estudos foram conduzidos para avaliar a relação entre nutrição e resposta imune dos peixes (Selvaraj et al., 2006; Ai et al., 2007; Sealey et al., 2008; Siwicki et al., 2009). Os ácidos graxos dietéticos têm efeitos benéficos diretos e indiretos sobre a resposta imune, na produção das citocinas (Endreas et al., 1989; Yaqoob & Calder, 1995; Pablo et al., 2002) ou na proliferação de linfócitos (Endreas et al., 1989; Meydani et al., 1991; Secombes, 1985; Yaqoob et al., 1994; Pablo et al., 2002). Em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), observou-se aumento da atividade bactericida de macrófagos no grupo alimentado com óleo de savelha em comparação aos peixes alimentados com óleo de soja, milho ou sebo bovino (Sheldon & Blazer, 1991). O aumento da atividade de macrófagos do rim pode estar associado ao aumento de ácidos graxos n-3 em bagre do canal (Blazer, 1992) e truta arco-íris (Ashton et al., 1994). Além disso, salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentado com dietas contendo altos níveis de n-3/ n-6 PUFA apresentou aumento na resposta do linfócito B e na taxa de sobrevivência quando desafiado com *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum* (Thompson et al., 1996).

Lin & Shiau (2005) reportaram que a suplementação dietética com ácido ascórbico aumentou as respostas imunes não específica de *E. malabaricus*, incluindo aumento da produção de ânion superóxido, da atividade do sistema complemento e da lisozima. Os mesmos autores também observaram maior sobrevivência dos peixes alimentados com a dieta suplementada com 288 mg AA kg<sup>-1</sup> após exposição à bactéria *Vibrio carchariae* em relação aos peixes alimentados com dieta isenta desta suplementação.

A suplementação com 200-400 mg kg<sup>-1</sup> de tocoferol e 4 ou 9% de lipídios resultou em melhor resposta imune dos peixes incluindo maior número de células de defesa orgânica, “burst” respiratório de leucócitos, atividade da lisozima e do sistema complemento, sugerindo que níveis elevados desta vitamina contribuem mais para a manutenção da imunidade do que para o crescimento (Lin & Shiau, 2005). Resultados similares foram observados no *Sparus aurata* (Ortuño et al., 2000; Cuesta et al., 2001).

Alguns estudos mostram que os carotenóides são suplementos benéficos para várias espécies de peixes, influenciando no desempenho dos reprodutores (Storebakken & Goswami,



1996) e da prole (Verakunpiriya et al., 1997) e aumentando a resistência à doenças (Tachibana et al., 1997). Dentre os carotenóides, a astaxantina e o  $\beta$ -caroteno se destacam por elevarem os fatores humorais (atividade complemento e lisozima) e celulares (fagocitose e citotoxicidade não-específica) da resposta imune (Amar et al., 2000; 2001).

Guimarães (2009) avaliou o efeito de megadoses (2500, 5000, 10000, 20000 UI kg<sup>-1</sup>) e ausência de vitamina A na dieta sobre o desempenho, parâmetros hematológicos, imunológicos e resistência de tilápias do Nilo à infecção experimental com *Streptococcus iniae*. A suplementação com vitamina A influenciou o crescimento dos animais e os melhores níveis para o ótimo fisiológico variaram de 1543 a 2403 UI kg<sup>-1</sup> da dieta. A deficiência da vitamina provocou redução no desempenho da espécie, hemorragias na pele, lábios e base das nadadeiras, apresentando quadro hemorrágico severo após 10 semanas, com deformidade óssea e nos opérculos, todavia, demonstrou limitada influência sobre as respostas imunes (produção de ânion superóxido, imunoglobulina sérica e atividade da lisozima) e na resistência dos animais à infecção por *S. iniae*. O autor sugeriu que a vitamina A possui grande poder antioxidante, evidenciado pela reduzida fragilidade eritrocitária. Sugeriu, ainda, que o excesso de vitamina A pode ocasionar problemas metabólicos a longo prazo.

Com relação à atuação da vitamina D<sub>3</sub> no sistema imune dos peixes, Cerezuela et al. (2009) administraram níveis (0, 3750, 18750, e 37500 UI kg<sup>-1</sup>) dessa vitamina na dieta de *Sparus aurata*, principal espécie criada no Mediterrâneo. Os peixes que receberam a dieta suplementada com 3750 UI vitamina D kg<sup>-1</sup> durante uma semana apresentaram aumento da atividade citotóxica natural dos leucócitos. Após duas semanas de alimentação, os peixes alimentados com dieta suplementada com os níveis 3750 e 18750 UI kg<sup>-1</sup> demonstraram aumento significativo da capacidade fagocítica dos leucócitos, e os peixes que receberam o nível mais alto da vitamina (37500 UI kg<sup>-1</sup>) demonstraram além de aumento da capacidade fagocítica também aumento da peroxidase no soro. Os autores sugerem que a vitamina D<sub>3</sub> influencia beneficemente os parâmetros do sistema imune inato de *Sparus aurata*.

Recentemente, algumas pesquisas avaliaram a relação entre os nutrientes fornecidos na dieta e a resposta imune de peixes nativos (Abreu, 2007; Biller, 2008). Em pacus, a suplementação de 1% de  $\beta$ -glucano por sete dias promoveu aumento da atividade respiratória dos leucócitos, da atividade da lisozima e da atividade de proteínas do sistema complemento dos pacus inoculados com *A. hydrophila* (Biller, 2008).

#### **4. Imunoestimulantes**

Os imunoestimulantes são consideradas substâncias biológicas que possuem capacidade de influenciar e aumentar os mecanismos específicos e não específicos de defesa dos animais (Raa, 1996; Verlhac et al., 1998; Vainikka et al., 2005; Chagas et al., 2009).

Os efeitos benéficos dos imunoestimulantes consistem em aumentar a atividade de macrófagos, fagocitose por neutrófilos e monócitos e maior produção de linfócitos, imunoglobulinas e lisozima (Sakai, 1999), além de estimular o crescimento e/ou a atividade de bactérias benéficas do trato gastrointestinal do hospedeiro (Gibson & Roberfroid, 1995), com otimização da superfície de absorção intestinal (Silva & Nörnberg, 2003).

Dentre os compostos com características imunoestimulantes destacam-se os fatores nutricionais como as vitaminas, substâncias derivadas de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, além das substâncias químicas sintéticas (Sakai, 1999; Cook et al., 2003; Smith et al., 2003; Vainikka et al., 2005; Li & Gatlin III, 2006). Estes compostos são de fácil administração e apresentam baixa toxicidade para o hospedeiro, podendo ser administrados por meio de imersão, injeção ou como um suplemento dietário (Smith et al., 2003).

##### **4.1. Glucanos**

Os  $\beta$ -glucanos são macromoléculas formadas por blocos de glicose unidos por meio de ligações  $\beta$  (1-3) e  $\beta$  (1-6), sendo normalmente encontrados nas células de levedura e fungos e funcionam como imunoestimulante em mamíferos (DiLuzio, 1985) e em peixes (Robertsen et al., 1990; Cook et al., 2003).

O mecanismo de ação do  $\beta$ -glucano se dá por meio de receptores específicos localizados na superfície dos macrófagos (Jorgensen & Robertsen, 1995), cuja existência foi observada “in vitro” em macrófagos de salmão do Atlântico (Engstad & Robertsen, 1993). Nos peixes, o  $\beta$ -glucano pode favorecer a estimulação dos mecanismos de defesa não-específicos, estimulando a atividade fagocitária dos macrófagos e aumentando assim sua capacidade para eliminar os patógenos (Jorgensen et al., 1993; Jorgensen & Robertsen, 1995; Cook et al., 2003). O  $\beta$ -glucano é responsável também por incrementar a produção de proteínas líticas como a lisozima e as do sistema complemento (Engstad et al., 1992; Paulsen et al., 2001).

Baixas concentrações de  $\beta$ -glucano são efetivas para estimular as funções imunes não-específicas em peixes (Robertsen et al., 1994; Santarém et al., 1997), enquanto altas concentrações podem exaurir as células fagocíticas, prejudicando a potência e rapidez das respostas frente à exposição ao patógeno (Castro et al., 1999).

A efetividade do  $\beta$ -glucano em peixes foi demonstrada na defesa contra as bactérias *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio salmonicida* e *Pasteurella piscicida* (Nikl et al., 1993) e *Aeromonas hydrophila* (Biller, 2008; Chagas et al., 2008), além de aumentar a eficiência dos protocolos de vacinação por aumentar a produção de anticorpos contra proteínas presente na superfície das bactérias (Sherwood et al., 1987; Selvaraj et al., 2005; Whittington et al., 2005).

Na literatura há vários estudos descrevendo o efeito benéfico do  $\beta$ -glucano sobre o desempenho produtivo dos peixes, principalmente quanto ao aumento da taxa de crescimento de diferentes espécies de peixes (Cook et al., 2003; Misra et al., 2006; Ai et al., 2007; Sealey et al., 2008; Dalmo & Bogwald, 2008), contudo, não existe explicação plausível para este fato. Os estudos de Whittington et al. (2005), Bagni et al. (2005), Welker et al. (2007) e Chagas et al. (2008) contrapõem esses achados, visto que eles não observaram nenhum aumento significativo no crescimento dos peixes alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano. No híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis* a suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta por seis semanas não promoveu efeito significativo sobre o desempenho produtivo da espécie, ocasionando redução do ganho de peso e conversão alimentar, além de não produzir melhoras na resistência às doenças e na atividade da lisozima (Jaramillo Jr & Gatlin III, 2004). Essa divergência nos resultados, em parte, é explicada pelas diferentes respostas obtidas na absorção do  $\beta$ -glucano no intestino (Dalmo & Bogwald, 2008), podendo essa divergência ser originada também em função do método de administração, quantidade de  $\beta$ -glucano incorporada na dieta, duração da administração, temperatura ambiental e a da espécie em estudo (Cook et al., 2003; Abreu, 2007; Sealey et al., 2008; Dalmo & Bogwald, 2008).

O uso do  $\beta$ -glucano (G) e de mistura de imunoestimulante a base de aminoácidos e nucleotídeos (BAISM - B) como imunoestimulantes e promotores de crescimento foi avaliado em juvenis de *Paralichthys olivaceus*. Neste estudo, Yoo et al. (2007) observaram que os peixes alimentados com as dietas G0,1+B0,9, G0,1+B1,9 e G0,15+B1,35 obtiveram maior ganho de peso, fator de condição e taxas de eficiência alimentar, crescimento específico e eficiência protéica. Ainda, a atividade de lisozima dos peixes alimentados com G0,1+B0,9 foi significativamente maior que o observado nos demais grupos. Estes resultados indicam que o nível de suplementação dietética ótima para juvenis de *Paralichthys olivaceus* é de 0,10% de  $\beta$ -1,3 glucano + 0,90% de BAISM.

Falcon (2007) avaliou a suplementação da dieta de tilápia do Nilo com diferentes níveis de  $\beta$ -glucano (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8%) e vitamina C (400 e 600 mg kg<sup>-1</sup> dieta) durante 60 dias e observou que essa suplementação não teve influência no desempenho produtivo da espécie. Ainda, após o estímulo pelo frio e desafio com *Aeromonas hydrophila* observou-se

melhores respostas dos intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, em tilápias alimentadas com dieta suplementada com 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600 mg de vitamina C  $\text{kg}^{-1}$  da dieta.

Com espécies nativas como o pacu, a suplementação de 0,1, 0,2 e 0,3% de  $\beta$ -glucano nas rações por 90 dias não promoveu melhoras no desempenho produtivo dos juvenis e não provocou alterações nos parâmetros fisiológicos e indicadores de estresse. Entretanto, em 30 e 60 dias de suplementação com 0,1% de  $\beta$ -glucano houve maior sobrevivência dos pacus desafiados com *Aeromonas hydrophila* (Schorer, 2008).

Existem evidências de que o aumento na taxa de crescimento dos peixes, resposta de estresse e resistência à doenças são dependentes dos níveis de  $\beta$ -glucano incorporado na ração, da via de administração, bem como do período de fornecimento da dieta (Dalmo & Bogwald, 2008).

Abreu (2007) avaliou as vias de administração do  $\beta$ -glucano, injeção intraperitoneal ou adicionado à ração, em pacus e observou que não houve alteração hematológica em ambas as vias testadas. Por outro lado, com a injeção intraperitoneal de  $\beta$ -glucano houve aumento da atividade respiratória dos leucócitos após quatro (10 $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -glucano) e 10 dias (50 $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -glucano), assim como maior atividade de lisozima nos peixes injetados com 10 $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -glucano e nos que receberam a suplementação de 1,0% de  $\beta$ -glucano na dieta.

Com relação ao tempo adequado para administração (7, 15, 30 e 45 dias) das dietas suplementadas de 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600 mg de vitamina C  $\text{kg}^{-1}$  dieta para juvenis de tilápia do Nilo, Falcon (2007) relatou que o tempo de 15 dias ou mais proporcionou aumento da resistência orgânica dos peixes frente aos desafios: estímulo pelo frio, estresse por transporte e *Aeromonas hydrophila*.

Segundo Biller (2008), a suplementação de 0,1% de  $\beta$ -glucano por sete dias na dieta do pacu promoveu maior sobrevivência dos peixes desafiados com *A. hydrophila*, e houve aumento das células leucocitárias, número de trombócitos e níveis de proteína total. Em sete dias de suplementação com 1% de  $\beta$ -glucano, ocorreu aumento da atividade respiratória dos leucócitos, da atividade da lisozima e da atividade de proteínas do sistema complemento dos pacus inoculados com *A. hydrophila*. Essa autora enfatiza que a utilização do  $\beta$ -glucano melhorou o sistema imune inato desta espécie.

A administração de dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano mostrou ser benéfica na prevenção dos efeitos negativos do estresse em peixes, ressaltando a importância do emprego de imunostimulantes como medida profilática (Anderson, 1992; Selvaraj et al., 2005). Em

*Oncorhynchus mykiss*, houve supressão das respostas primárias e secundárias do estresse de transporte, sugerindo que baixos níveis de  $\beta$ -glucano poderiam ser administrados na dieta antes do transporte para prevenir esses efeitos negativos (Jeney et al., 1997). Em pacus expostos ao estresse de captura, Abreu (2007) observou que a administração do  $\beta$ -glucano, por injeção intraperitoneal ou adicionado à ração, não afetou os parâmetros hematológicos, e não minimizou as alterações provocadas pelo estresse. Cinco minutos após o início do protocolo de estresse, houve aumento da atividade respiratória dos leucócitos em pacus alimentados com dietas suplementadas com 0,1% e 0,5% de  $\beta$ -glucano.

A utilização de vacinas na aquicultura torna-se cada vez mais importante, pois além de proteção imune elas aumentam a taxa de crescimento e promovem boa eficiência na conversão alimentar (Grove et al., 2003). Com esse intuito, Pilarski et al. (2009) avaliaram o efeito da suplementação com diferentes níveis de  $\beta$ -glucano e da vacina oleosa com cepa inativada de *Flavobacterium columnare* sobre as respostas hematológicas e resistência de juvenis de tilápia. Estes autores relataram que para os peixes que receberam dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vacinados houve diferença significativa na contagem total de células e trombócitos. A porcentagem das células brancas foi maior nos peixes vacinados e suplementados com 1,5% de  $\beta$ -glucano e com relação aos trombócitos, a porcentagem dessas células foi maior nos peixes vacinados e suplementados com 0,1% de  $\beta$ -glucano. Após o desafio com *F. columnare* observou-se maior porcentagem de mortalidade dos peixes no grupo suplementado com 3,0% de  $\beta$ -glucano e no grupo controle, enquanto nenhuma mortalidade foi registrada nos peixes alimentados com 0,1% de  $\beta$ -glucano. A administração de uma dose única de vacina de *F. columnare* por injeção intraperitoneal e a suplementação de 0,1% de  $\beta$ -glucano foi eficaz para prevenir a ocorrência de columnariose.

#### **4.2. Nucleotídeos**

Os nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, um monossacarídeo pentose e um, dois ou três grupos fosfatos (Champe & Harvey, 1996). Eles possuem funções fisiológicas e bioquímicas essenciais que incluem numerosas reações de transferência de grupos fosfatos, tanto do ATP como de outros nucleotídeos trifosfatos, que suprem as reações endergônicas, atuando também na formação de inúmeras coenzimas, tais como flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP), coenzima A e S-adenosil-metionina e como efetores alostéricos e agonistas celulares (Carver & Walker, 1995; Cosgrove, 1998).

Os organismos vivos podem sintetizar quantidades adequadas de nucleotídeos exigidos para crescimento e desenvolvimento normais. Entretanto, alguns tecidos têm uma capacidade limitada para realizar a síntese “de novo” e dependem de compostos fornecidos pela “via de salvamento”, tais como a mucosa intestinal, células hematopoiéticas e o cérebro (Yamamoto et al., 1997).

A suplementação de nucleotídeos torna-se essencial quando a síntese endógena não é suficiente para atender às funções normais (Carver & Walker, 1995). Por outro lado, Grimble & Westwood (2000) relatam que a deficiência dietética de nucleotídeo pode prejudicar as funções do fígado, coração, intestino e imune. Os nucleotídeos tornam-se essenciais em determinadas condições, pois o seu consumo pode poupar o organismo dos custos da síntese “de novo” e da “via de salvamento”, conseqüentemente, otimizando as funções dos tecidos e/ou órgãos. As condições indicadas para seu uso são: alguns estados de doença, períodos de consumo limitado de nutrientes, crescimento rápido e na presença de fatores regulatórios ou de desenvolvimento que interferem na capacidade de síntese endógena (Carver & Walker, 1995).

Os efeitos benéficos da suplementação de nucleotídeos na dieta incidem sobre o crescimento, metabolismo de lipídios, funções hepáticas, na maturação, ativação e proliferação dos linfócitos, assim como na fagocitose de macrófago e expressão gênica de certas citocinas (Gil, 2002). López-Navarro et al. (1995) relataram que os nucleotídeos dietéticos são responsáveis por modular o metabolismo dos nucleotídeos do fígado, e que este é o órgão mais importante para estocagem de nucleotídeos e transporte inter-órgão visando atender as necessidades fisiológicas (Gatlin III & Li, 2007).

Os nucleotídeos estão naturalmente presentes em todos os alimentos de origem animal e vegetal como nucleotídeos livres e ácidos nucléicos. Atualmente, vários suplementos de nucleotídeos são disponíveis no mercado, sendo estes mononucleotídeos e/ou oligonucleotídeos derivados da levedura (Gatlin III & Li, 2007).

A incorporação de misturas comerciais contendo nucleotídeos nas dietas de peixes resultam em melhor ganho de peso, contudo é provável que esta resposta varie em função da espécie e concentração administrada (Bagni et al., 2005; Choudhury et al., 2005; Li & Gatlin III, 2006). Alguns estudos mostram melhor crescimento em larvas de tilápia (Ramadan & Atef, 1991), juvenis de truta arco-íris (Adamek et al., 1996) e de *Sciaenops ocellatus* (Gatlin III & Li, 2007). Por outro lado, para a maioria de juvenis e peixes sub-adultos, a influência da

suplementação de nucleotídeos dietéticos no crescimento tem se mostrado até certo ponto marginal (Li et al., 2004; Gatlin III & Li, 2007).

Os nucleotídeos dietéticos influenciam benéficamente o sistema imune dos peixes por inibir a liberação do cortisol em situações de estresse (Gatlin III & Li, 2007). Em estudos conduzidos com truta arco-íris, Leonardi et al. (2003) observaram que a suplementação da dieta com nucleotídeos reduziu os níveis de cortisol após 90-120 dias de alimentação, tanto nos peixes saudáveis quanto nos infectados com o vírus da necrose pancreática infecciosa. Esta redução do estresse também resultou no aumento da resistência à doenças nos peixes desafiados.

A suplementação de nucleotídeos na dieta de peixes interfere nas respostas imunes e aumenta a resistência à doenças (Burrels et al., 2001; Leonardi et al., 2003; Low et al., 2003). Em salmonídeos, essa suplementação aumentou a resistência dos peixes à infecções virais, bacterianas e parasitárias, e ainda melhorou a eficácia da vacinação e a capacidade osmorregulatória (Burrels et al., 2001). A suplementação de nucleotídeos pode influenciar ambos os componentes humoral e celular do sistema imune inato. Segundo Sakai et al. (2001), essa suplementação ocasionou estimulação do sistema complemento sérico pela via alternativa, da atividade de lisozima e da fagocitose em carpa comum.

No caso do híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, Li et al. (2004) relataram que a suplementação com nucleotídeos por oito semanas antes da exposição a *S. iniae* reduziu a mortalidade e quando os animais foram expostos novamente à bactéria a mortalidade foi de 52%, sendo esta significativamente menor que a observada nos peixes do grupo controle (83,8%).

Lin et al. (2009) avaliaram o efeito de uma mistura comercial de nucleotídeo contendo inosina monofosfato (IMP), adenosina monofosfato (AMP), guanosina monofosfato (GMP), uridina monofosfato (UMP) e citidina monofosfato (CMP), assim como a suplementação de cada nucleotídeo individualmente sobre o desempenho produtivo de *Epinephelus malabariscus*. Os resultados do estudo mostraram que os peixes alimentados com 1,5 g da mistura de nucleotídeos kg<sup>-1</sup> de ração ou com 1,5 g de AMP kg<sup>-1</sup> de ração obtiveram maior ganho de peso, produção de anion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e concentração de imunoglobulina, ressaltando ainda que tanto a mistura de nucleotídeos quanto a suplementação de nucleotídeos na forma de adenosina monofosfato (AMP) foram mais benéficos para a resposta imune da garoupa do que os outros nucleotídeos fornecidos isoladamente.

## 5. Estresse em peixes

Estresse é uma condição na qual o equilíbrio fisiológico dinâmico, ou homeostase, de determinado organismo é perturbado ou influenciado por um estímulo intrínseco ou extrínseco, denominado estressor (Barton & Iwama, 1991).

Os peixes, frente a um agente estressor, têm a capacidade natural de responder fisiologicamente. Entretanto, a resposta de estresse pode ser deletéria à saúde dos peixes, quando os mecanismos de resposta são forçados além de seus limites normais (Barton & Iwama, 1991). As respostas ao estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária (Barton & Iwama, 1991). Em geral, diante de um estressor, a resposta primária consiste na liberação de hormônios como o cortisol (Barton & Iwama, 1991; Acerete et al., 2004); a secundária está relacionada ao metabolismo energético, como hiperglicemia e alteração da homeostase eletrolítica no sangue e tecidos (Barton & Iwama, 1991; McDonald & Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997); a terciária inclui o comprometimento no desempenho, mudanças no comportamento e aumento da suscetibilidade à doenças (Wedemeyer, 1996; Wendelaar Bonga, 1997).

O cortisol é um dos indicadores primários mais utilizado para a caracterização do estresse em peixes (Barton & Iwama, 1991; Acerete et al., 2004; Wendelaar Bonga, 1997). Ele apresenta amplo espectro de atividade em peixes, combinando funções mineralocorticóides e glicocorticóide (Wendelaar Bonga, 1997). A ação do cortisol em peixes inclui regulação do equilíbrio hidromineral e metabolismo energético, redução da taxa de crescimento, supressão da função reprodutiva e do sistema imune dos animais (Wendelaar Bonga, 1997).

Níveis elevados de glicose, relatada em muitas espécies de peixes, é uma das respostas secundárias mais utilizadas para quantificação de estresse nestes organismos (Barton & Iwama, 1991; McDonald & Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). A hiperglicemia é mediada principalmente pelo efeito da indução exercida pelas catecolaminas sobre a liberação de glicose do fígado, sendo a glicogenólise o principal processo de liberação de glicose para o plasma (Wendelaar Bonga, 1997). Na resposta de estresse, a mobilização da glicose ocorre como um meio para fornecer energia extra ao animal, para que este possa superar o distúrbio imposto (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997).

As análises hematológicas são utilizadas largamente na avaliação do estado de saúde de peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Tavares-Dias et al., 2009), sendo importante ferramenta para identificação do estresse que o ambiente e os parasitos podem impor aos peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Tavares-Dias et al., 2009). Nesse sentido, o



estabelecimento de valores de referência das variáveis hematológicas para as principais espécies cultivadas são de extrema importância no diagnóstico de doenças (Tavares-Dias & Moraes, 2007; Tavares-Dias et al., 2009). Os valores de referência para os parâmetros eritrocitários foram recentemente determinados em animais de cultivo como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), a matrinxã (*Brycon amazonicus*), pirarucu (*Arapaima gigas*), surubim híbrido (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *P. corruscans*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Tavares-Dias et al., 2009). Anteriormente, os valores de referência dessas variáveis eram provenientes de animais coletados na natureza (Marcon et al., 1999).

O transporte de peixes, que envolve procedimentos de captura, confinamento, manuseio, adensamento e o transporte propriamente dito, é prática indispensável na aquicultura; contudo tal prática induz respostas de estresse, com consequências negativas sobre o desempenho produtivo, resposta imune e resistência dos peixes a patógenos (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2000; Barton et al., 2000; Brandão et al., 2006; Gomes et al., 2006).

Em espécies nativas como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pirarucu (*Arapaima gigas*), a matrinxã (*Brycon amazonicus*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e o jundiá (*Rhamdia quelen*) várias alterações hormonais, metabólicas, iônicas e hematológicas, em decorrência do estresse, foram registradas (Barcellos et al., 2001; Gomes et al., 2003; Gomes et al., 2006; Urbinati & Carneiro, 2006; Takahashi et al., 2006; Brandão et al., 2008; Fagundes & Urbinati, 2008; Carneiro et al., 2009).

Durante o transporte o principal promotor do estresse é a abrasão mecânica causada pelo inevitável contato entre os peixes quando a densidade de estocagem é elevada (Ross & Ross, 1999). Nesse sentido, o efeito da densidade de carga (78, 156, 234 e 312 g L<sup>-1</sup>) no transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*), em sistema fechado, por 10 horas foi avaliado sobre os níveis de cortisol e glicose plasmática. Os autores observaram aumento nos níveis desses indicadores de estresse e, conseqüentemente, redução da sobrevivência da espécie. A melhor densidade de carga para o transporte de tambaqui em sistema fechado, por 10 horas, foi estabelecida em 78 g L<sup>-1</sup> (Gomes et al., 2003). De forma semelhante, Abreu et al. (2008) avaliaram o efeito da densidade de carga (83, 125, 168 e 206 g L<sup>-1</sup>) no transporte de matrinxã (*Brycon amazonicus*) por quatro horas. Em todas as densidades avaliadas houve aumento dos níveis de cortisol e glicose sanguínea após o transporte, não sendo observada mortalidade até uma semana após o transporte.

Em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), as respostas fisiológicas de estresse causadas pelo transporte por quatro horas em sistema fechado, utilizando diferentes densidades (75, 150, 250 e 350 g L<sup>-1</sup>), ocasionaram elevação dos níveis plasmáticos de cortisol e amônia, sendo estes valores mais expressivos na maior densidade de transporte (Carneiro et al., 2009). Ainda, com jundiás, machos e fêmeas, altos níveis de cortisol e glicose plasmática foram observados após captura e transferência de tanques (Barcellos et al., 2001).

Brandão et al. (2006) avaliaram as respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em sistemas de criação como o transporte, adensamento e exposição à amônia. Os autores observaram que as respostas de estresse, avaliadas por meio de indicadores como cortisol, glicose, lactato e hematócrito, durante o transporte foram similares as do adensamento, porém, a magnitude das respostas do adensamento foi maior. Quando da exposição à amônia, esta prática não causou alteração imediata nos parâmetros fisiológicos, havendo latência na resposta de estresse. As alterações fisiológicas do pirarucu frente aos agentes estressores, de forma geral, ocorreram no momento mais intenso do manejo, o que facilita minimizá-las com a adoção de boas práticas de manejo durante a criação de peixes.

O conhecimento das respostas de estresse em operações de transporte de peixes é primordial para o estabelecimento de práticas de manejo adequadas (Wedemeyer, 1997), principalmente aquelas que reduzam a mortalidade dos peixes pós-transporte (Takahashi et al., 2006; Sink & Neal, 2009). Assim, muitos pesquisadores avaliaram alguns produtos para minimizar o efeito do estresse como cloreto de sódio (Gomes et al., 2003; Gomes et al., 2006; Urbinati & Carneiro, 2006; Brandão et al., 2008), sulfato de cálcio (Bendhack & Urbinati, 2009) e anestésicos (Urbinati & Carneiro, 2001; Sink & Neal, 2009); além do emprego de imunostimulantes na dieta (Sakai, 1999; Li & Gatlin III, 2006; Dalmo & Bogwald, 2008).

## **6. Vacinação de peixes**

A vacinação é um método de imunostimulação específica utilizada nos humanos e animais, incluindo os peixes (Iwama & Nakanishi, 1996). A vacina é um imunógeno não-patogênico que, quando inoculado num hospedeiro, induz imunidade protetora contra um patógeno específico do qual é derivado. Algumas vacinas são preparadas a partir de bactérias ou vírus, utilizando-se para isto organismos potencialmente patogênicos mortos por tratamento químico ou calor ou então atenuados, o que significa dizer que perderam a capacidade de produzir a doença (Parslow, 2004).

Na aquicultura, as vacinas utilizadas consistem de preparações de bactérias vivas atenuadas, células mortas ou extratos celulares que são administrados aos peixes por injeção

ou imersão (Gatlin III, 2002). No desenvolvimento de vacinas para peixes há necessidade de se compreender os mecanismos básicos da diferença entre a proteção alcançada por vacinas inativadas e a forte imunidade induzida por vacinas de DNA. No caso dos antígenos inativados, a maioria destes não irá induzir resposta imune adequada quando administrados na ausência de adjuvante (Dalmo & Bogwald, 2008).

Os adjuvantes intensificam a resposta a um imunógeno quando administrados conjuntamente. A ação dos adjuvantes consiste em prolongar a retenção do imunógeno, aumentar o tamanho efetivo do imunógeno, promovendo assim a sua fagocitose e apresentação pelos macrófagos, estimulando o influxo de macrófagos ou outros tipos de células imunológicas para o local de injeção ou promovendo a produção local de citocinas e outras atividades imunológicas dessas células (Parslow, 2004).

Os imunoestimulantes tem sido usados como adjuvantes para aumentar a potência e eficácia da vacina, além de ativar as células apresentadoras de antígenos como os macrófagos para produzir mais moléculas sinalizadoras, como as citocinas, que por sua vez recrutam outras células do sistema imune (Raa, 2000). Quando administrados antes, com, ou após as vacinas, os imunoestimulantes amplificam a resposta imune específica por aumentar os níveis de anticorpos circulantes (Anderson, 1992).

O uso de vacinas para enfermidades bacterianas em peixes é realidade em vários países do mundo, principalmente no Chile, Noruega e Estados Unidos. Há grande potencial para pesquisa no campo da vacinologia de peixes, podendo ser as doenças bacterianas controladas pela vacinação, especialmente as infecções causadas pelo grupo das *Aeromonas* móveis (Gudding et al., 1999; Kamilya et al., 2006).

No grupo de bactérias das *Aeromonas* móveis (*Aeromonas hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. allosaccharophila* e *A. veronii*), consideradas como patógenos oportunistas de peixes (Toranzo et al., 1989; Esteve et al., 1995; Austin & Austin, 1999; Guzman-Murillo et al., 2000; Kozinska et al., 2002), a espécie *Aeromonas bestiarum* foi utilizada no preparo de vacinas para carpa (*Cyprinus carpio*) (Kozinska & Guz, 2004), sendo avaliadas três preparações de vacinas: bactéria atenuada com formalina e emulsificada com óleo, bactéria morta por formalina e lipopolissacarídeo (LPS), as quais apresentaram eficácia para carpas quando desafiadas com cepa homóloga de *A. bestiarum*. Após a vacinação, os peixes apresentaram altos níveis de atividade fagocítica, anticorpos e lisozima.

Vacinas também estão sendo desenvolvidas para *Aeromonas hydrophila* (Karunasagar et al., 1993), mas estas não são ainda comercialmente disponíveis. Na espécie Catla (*Catla catla*), o emprego de glucano como adjuvante aumentou a eficácia da vacina contra *A.*

*hydrophila*. Um bom nível de proteção contra *A. hydrophila* foi observado em todos os grupos de peixes vacinados após o desafio bacteriano (Kamilya et al., 2006).

A vacinação oral é um método alternativo de imunização em sistemas de criação intensiva de peixes. Contudo, sua efetividade é limitada devido à degradação da vacina no trato digestório dos peixes. Nesse sentido, uma vacina oral contra *Aeromonas hydrophila* foi avaliada pela produção de pequenas microesferas biocompatíveis de alginato estáveis capturando células inativadas de *A. hydrophila*. Partículas esféricas e não agregadas de alginato com diâmetro menor que 50 µm foram obtidas por emulsificação controlada empregando óleo de milho e “Span 80”, o que resultou numa eficiência de incorporação da bactéria de 100% e carga acima de 14 mg mL<sup>-1</sup> de partículas úmidas. Estas partículas foram estáveis, nas condições do trato gastrointestinal, por tempo superior a 12 horas e demonstraram alto potencial tecnológico para uso em imunização de peixes (Rodrigues et al., 2006).

Outro método de vacinação oral foi desenvolvido por Nayak et al. (2004), que consistiu no preparo de biofilme de *Aeromonas hydrophila* que foi administrado incorporado na dieta de “walking catfish” (*Clarias batrachus*) durante 20 dias. Os resultados deste estudo mostram que os níveis de anticorpo e a porcentagem relativa de sobrevivência após o desafio bacteriano foram significativamente maiores nos peixes vacinados com o emprego do biofilme.

Nos Estados Unidos, há uma vacina licenciada para uso que consiste numa vacina de imersão preparada com bactéria viva para columnariose (AQUAVAC-COL, Intervet/Schering-Plough), indicada para uso no bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Bebak et al., 2009). Essa vacina foi avaliada em alevinos de “largemouth bass” (*Micropterus salmoides floridanus*) com a redução da mortalidade de peixes desafiados com *Flavobacterium columnare* (Bebak et al., 2009). Outras vacinas, como a Aplphaject 400<sup>®</sup> (Europharma, Oslo, Norway) e a Norvax Minova 4WD<sup>®</sup> (Intervet Norbio, Bergen, Norway) consistem de preparações múltiplas com eficácia contra furunculose (*Aeromonas salmonicida*), vibriose (*Vibrio anguillarum*) e vibriose de água fria (*Vibrio salmonicida*); sendo que a segunda vacina protege também contra úlcera de inverno (*Moritella viscosa*) (Rungruangsak-Torrissen et al., 2009).

Diferentes tipos de vacinas efetivas contra “viral nervous necrosis” (VNN) causada por nodavírus, que ocasiona anormalidades neurológicas como natação errática, lesões no sistema nervoso central e retina, foram avaliadas por imunização via injeção (Yamahita et al., 2009). Uma única injeção de vacina inativada para “red-spotted grouper nervous necrosis

vírus” (RGNNV) sem adjuvante foi efetiva em induzir imunidade protetora com produção de anticorpos em garoupas (*Epinephelus septemfasciatus*) (Yamashita et al., 2005; 2009).

No Brasil, os primeiros resultados com vacinação de peixes foram relatados por Pilarski (2006), que estudou o efeito da suplementação com vitamina C na eficácia de vacina atenuada contra *Flavobacterium columnare* injetada intraperitonealmente em tilápias do Nilo e concluiu que a administração de 500 mg de ácido ascórbico/kg de ração potencializou o efeito da vacina, pois mitigou os efeitos nocivos do estresse, contribuindo para a redução de cortisol plasmático e aumento de células de defesa orgânica.

Pilarski et al. (2009) avaliaram o efeito da suplementação de diferentes níveis de  $\beta$ -glucano e da vacina oleosa com cepa inativada de *Flavobacterium columnare* sobre as respostas hematológicas e resistência de juvenis de tilápia. Estes autores relataram que para os peixes alimentados com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vacinados houve diferença significativa na contagem total de células e trombócitos. A porcentagem das células brancas foi maior nos peixes vacinados e alimentados com dieta suplementada com 1,5% de  $\beta$ -glucano e com relação aos trombócitos, a porcentagem dessas células foi maior nos peixes vacinados e alimentados com dieta suplementada com 0,1% de  $\beta$ -glucano. Após o desafio com *F. columnare* observou-se maior porcentagem de mortalidade dos peixes no grupo alimentado com dieta suplementada com 3,0% de  $\beta$ -glucano e no grupo controle, enquanto nenhuma mortalidade foi registrada nos peixes alimentados com dieta suplementada com 0,1% de  $\beta$ -glucano. A administração de uma dose única de vacina de *F. columnare* por injeção intraperitoneal e a suplementação de 0,1% de  $\beta$ -glucano foi eficaz para prevenir a ocorrência de columnariose.

### **6.1. *Aeromonas hydrophila***

A bactéria *Aeromonas hydrophila* é comum em ambientes aquáticos de todo o mundo. Frequentemente causa a enfermidade conhecida como septicemia hemorrágica em peixes de água doce (Merino et al., 1995; Kirov et al., 2002; Who, 2004) e outros vertebrados, incluindo o homem (Vivas et al., 2004; Castilho et al., 2009). Embora receba notória atenção como importante patógeno de peixes, ela também compõe parte da microflora normal do intestino de peixes saudáveis (Cipriano, 2001). Também é considerada parte da flora autóctona do meio aquático, podendo ser isolada de águas continentais ou marinhas, contaminadas ou não (Barja & Estevez-Toranzo, 1988).

A habilidade do patógeno de localizar, atacar e conseqüentemente infectar o hospedeiro susceptível é o primeiro passo para o desenvolvimento da doença.

Conseqüentemente, fatores produzidos pela bactéria, que podem facilitar o contágio, são importantes elementos de virulência bacteriana. Dentre eles destaca-se a fimbria, que facilita sua adesão às células do hospedeiro (Cipriano, 2001).

Essas bactérias possuem ainda fatores hemorrágicos e toxinas letais, como enterotoxinas, fator dermonecrótico, hemoaglutininas, hemolisina, citotoxinas, proteases, endotoxinas, adesinas, proteinases e quitinases. Essas toxinas têm a capacidade de atacar e selecionar células hospedeiras via ação de adenosinas (Trust et al., 1980). A membrana externa também tem importante papel na interação com hospedeiro na patogenicidade da bactéria durante aderência, retirada de nutrientes e eliminação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Seltman & Holst, 2002). Ela também possui antigenicidade protetora, devido aos componentes da membrana externa serem facilmente reconhecidos como substâncias estranhas pelo sistema de defesa imune do hospedeiro (Seltman & Holst, 2002).

A *Aeromonas hydrophila* é um bacilo gram-negativo que possui flagelo móvel, é aeróbia, citocromomooxidase positiva, fermentadora de glicose, aeróbia ou anaerobicamente. O crescimento da bactéria ocorre em meios simples, as colônias podem crescer de um a três milímetros de diâmetro a 25,0 °C, durante 48 horas, sendo arredondadas, brilhantes e de coloração creme (Alexandrino et al., 2000). Elas podem crescer na ausência de cloreto de sódio, em temperaturas mínimas de 0 a 5 °C e máximas de 38 a 41 °C, em pH entre 5 a 9 (Altwegg & Geiss, 1989).

Consideradas oportunistas, se manifestam em hospedeiros debilitados ou infectados por outros patógenos, como outras bactérias, vírus ou parasitos (Dooley & Trust, 1988; Merino et al., 1995). Neste caso, o estresse, principalmente provocado por condições ambientais e fisiológicas adversas, é considerado um fator pré-disponente ao aparecimento da doença causada por esta bactéria (Jeney & Jeney, 1995).

A infecção por *Aeromonas* móveis é provavelmente a doença bacteriana mais comum de peixes de água doce, sendo esta bactéria comumente isolada da superfície da mucosa e órgãos internos de peixes clinicamente saudáveis (MacMillan, 1985), além da alta prevalência da bactéria estar associada com águas organicamente poluídas (Hazen et al., 1978). Em peixes de água doce, as espécies de bactérias que causam problemas dentro do gênero *Aeromonas* são: *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. cavia* (Belém-Costa, 2001).

Fatores de riscos predisponentes incluem alta temperatura, altas densidades de estocagem, poluição orgânica e hipóxia. As *aeromonas* móveis geralmente invadem feridas na pele, comumente com infecções fúngicas ou ectoparasitos (Noga, 1986). Está geralmente associada com outros patógenos, como o protozoário *Epistylis*, responsáveis por causar lesões

na pele conhecida como “red-sore disease” (Esch & Hazen, 1980). A enfermidade pode aparecer na forma hiperaguda sem lesões aparentes, na forma aguda com hemorragia nas brânquias, ao redor do ânus e órgãos internos, além das formas subaguda e crônica (Barja & Estevez-Toranzo, 1988).

A severidade da enfermidade é influenciada por grande número de fatores inter-relacionados, incluindo a virulência da bactéria, o tipo e grau de estresse sofrido pela população de peixes, condição fisiológica e grau de resistência genética do hospedeiro (Cipriano, 2001). Os sinais clínicos característicos da aeromoniose são a septicemia hemorrágica, petéquias distribuídas por toda a superfície corporal do animal, anemia, corrosão das nadadeiras, ulcerações oculares, eritrodermatite, escamas protusas, exoftalmia e distensão abdominal por ascite (Karunasagar et al., 1989; Merino et al., 1995; Austin & Austin, 1999; Kirov et al., 2002). Histologicamente, os peixes podem exibir hiperplasia epitelial no intestino, congestão das leptomeninges no cérebro, trombose e inflamação na região periesclerótica e epitélio ocular (Fuentes & Perez, 1998). A infecção sistêmica é caracterizada por necrose difusa em diversos órgãos internos e a presença de melanomacrófagos. Internamente, o fígado e o rim são os órgãos alvo da septicemia aguda. O fígado pode tornar-se pálido ou ter coloração esverdeada enquanto o rim pode se tornar friável. Esses órgãos são atacados pela toxina bacteriana e perdem sua integridade estrutural (Huizinga et al., 1979). Quando os danos ao fígado e rim são extensos, o coração e o baço não são necessariamente prejudicados. Todavia, elipsóides esplênicos são frequentemente centros de intensa atividade fagocítica pelos macrófagos (Cipriano, 2001). Peixes em estágios avançados da doença apresentam também septicemia, depleção e necrose do tecido hematopoiético renal e esplênico, necrose da mucosa intestinal e necrose focal no coração, fígado, pâncreas e gônadas (Bach et al., 1978; Huizinga et al., 1979). A presença de melanina livre ou lipofucsina dos centros de melanomacrófagos rompidos é característico (Roberts, 1989).

Boijink & Brandão (2001) avaliaram o efeito da inoculação de suspensões de diferentes quantidades de células de *Aeromonas hydrophila* em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), sendo as concentrações de  $1,3 \times 10^9$  e  $3,5 \times 10^8$  UFC de *A. hydrophila* ml<sup>-1</sup> de solução salina letais para jundiá quando inoculados intramuscularmente.

A interação entre as vitaminas C e E na dieta de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não teve influencia sobre a taxa de mortalidade de peixes infectados com *A. hydrophila* em diferentes temperaturas. Não houve interação entre o nível de vitamina C e E quanto à mortalidade. Independente da suplementação vitamínica, após o desafio, os peixes menores apresentaram maior taxa de mortalidade que os maiores e o grupo mantido em ambiente com

temperatura mais alta apresentaram maior taxa de mortalidade após o desafio (Garcia et al., 2009).

Algumas espécies de *Aeromonas* são associadas a doenças em seres humanos, sendo classificadas pela OMS (2003) como patógenos veiculados pela água e por alimentos contaminados, de interesse emergente à saúde pública (Merino et al., 1995). Em seres humanos, esta bactéria pode causar febre, dor abdominal, vômitos, diarréias, meningite, endocardite, septicemia, inflamação do tecido conjuntivo e síndrome hemolítica urêmica, infecções respiratórias e intestinais, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (Janda & Abbott, 1998).

### Referências

- ABREU, J. S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com  $\beta$  1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura**. 2007. 123 f. Tese – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- ABREU, J. S.; SANABRIA-OCHOA, A. I.; GONCALVES, F. D.; URBINATI, E. C. Stress responses of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1413-1417, 2008.
- ACERETE, L.; BALASCH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v.237, p.167-178, 2004.
- ADAMEK, Z.; HAMACKOVA, J.; KOURIL, J.; VACHTA, R.; STIBRANYIOVA, I. Effect of ascogen probiotics supplementation on farming success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and wells (*Silurids glais*) under conditions of intensive culture. **Krmiva (Zagreb)**, v. 38, p. 11-20, 1996.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. Review. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 499-509, 2003.
- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394-402, 2007.
- ALEXANDRINO, A. C.; OKUMURA, M. P. M.; BALDASSI, L.; ARAUJO, A. P.; KURODA, C. K.; WAKASA, Y. S. Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo – relato de caso. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v.26, p.117-119, 2000.



- ALTWEGG, M.; GEISS, H. K. Aeromonas as a human pathogen. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 16, p. 253-286, 1989.
- ALVAREZ-PELLITERO, P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 171–198, 2008.
- AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE T. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 527-37, 2004.
- AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH, S.; OKAMOTO, N.; WATANABE, T. Effects of dietary b-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, v. 66, p. 1068-1075, 2000.
- AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 32, p. 162-173, 2001.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Disease**, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ARAKI, K.; AKATSU, K.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Characterization of CD8<sup>+</sup> leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8a. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 850–858, 2008.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 175-202.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 1998. 186 p.
- ARIDE, P. H. R.; ROUBACH, R.; VAL, A. L. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 588-594, 2007.
- ASHTON, I.; CLEMENTS, K.; BARROW, S. E.; SECOMBES, C. J.; ROWLEY, A. F. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1214, p. 253-262, 1994.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Chichester: Springer Praxis, 3<sup>rd</sup> Edition, 1999. 459p.

- AYROZA, D.M.M.R.; FURLANETO, F.P.B; AYROZA, L.M.S. Regularização dos projetos de tanques-rede em águas públicas continentais de domínio da união no Estado de São Paulo. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v.36, 2006.
- BACH, R.; CHEN, P. K.; CHAPMAN, G. B. Changes in the spleen of channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque induced by infection with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Fish Diseases**, v.1, p. 205 – 217, 1978.
- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOLA, M. G.; ABELLI, L.; SACAPIGLIATI, G.; TISCAR, P. G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, p. 311-25, 2005.
- BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C. E.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale* (tamoata) and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to different Amazonian waters. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 405-412, 2008.
- BALFRY, S. K.; IWAMA, G. K. Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 207– 211, 2004.
- BARCELLOS, L. J. G.; WOEHL, V.; WASSERMANN, G. F.; QUEVEDO, R. M.; ITTZÉS, I.; KRIEGER, M. H. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish.. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 121-124, 2001.
- BARJA J.; ESTEVEZ-TORANZO A. Enfermedades bacterianas de peces. In: ESPINOSA J. & UBARTA U. (Ed.). **Patología en Acuicultura**. Madrid, Espanha: Editora Mundi Prensa, p.475-550, 1988.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, p. 12-18, 2000.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Disease**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BARTON, B.A.; BOLLING, H.; HAUSKINS, B.; JANSEN, C.R. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns* x *S. platyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 126A, p. 125-134, 2000.

- BEBAK, J.; MATTHEWS, M.; SHOEMAKER, C. Survival of vaccinated, feed-trained largemouth bass fry (*Micropterus salmoides floridanus*) during natural exposure to *Flavobacterium columnare*. **Vaccine**, v. 27, p. 4297-4301, 2009.
- BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J. C. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v. 63, p. 281-284, 2006.
- BELEM-COSTA, A. Imunidade passiva em peixes. 2001. 6f. Qualificação (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BELO, M. A. A. **Recrutamento de macrófagos e formação de gigantócitos em *Oreochromis niloticus* submetidas a diferentes estímulos moduladores**. 2006. Tese - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- BENDHACK, F.; URBINATI, E. C. Calcium sulfate as stress reducer in matrinxã *Brycon amazonicus* transportation. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, p. 201-205, 2009.
- BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. Immunity. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC Press, 2 ed., p. 215-242, 1998.
- BEVERIDGE, M. C. M. **Cage aquaculture**, Oxford: Fishing News Books, 1996. 346p.
- BILLER, J. D. **Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano**. 2008. 114 f. Dissertação – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- BLAZER, V. S. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review of Fish Disease**, v. 2, p. 309-323, 1992.
- BLOM, J.; DABROWSKI, K. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1073-1080, 1995.
- BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v.31, p.687-690, 2001.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 349-356, 2006.

- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 357-362, 2004.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CRESCÊNCIO, R.; CARVALHO, E. S. Uso de sal durante o transporte de juvenis (1kg) de pirarucu (*Arapaima gigas*). **Acta Amazônica**, v. 38, p. 767-771, 2008.
- BRAUM, E.; JUNK, W. J. Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. **International Revue ges Hydrobiology**, v. 67, p. 869-886, 1982.
- BURRELS, C.; WILLIAM, P. D.; FORNO, P. F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. **Aquaculture**, v. 199, p. 159-169, 2001.
- CARNEIRO, P. C. F.; KAISELER, P. H. S.; SWAROFISKY, E. A. C.; BALDISSEROTTO, B. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 283-288, 2009.
- CARVALHO, M. L. **Alimentação do tambaqui jovem (*Colossoma macropomum*) e sua relação com a comunidade zooplanctônica do lago grande - Manaquiri, Solimões - AM.** 1981. 91p. Dissertação - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas.
- CARVER, J. D.; WALKER, W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, p. 58-72, 1995.
- CASTILHO, M., C. B.; CASTRO, T. L. A.; ARAÚJO, V. S.; TRAJANO, R. S.; SANTOS, P. A.; PIMENTA, P. M. C.; LUCHEZE, K.; MELO, J. T. B.; GONÇALVES, A. M.; NOGUEIRA, R. T.; LUNA, M. G.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* ssp. isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 53-61, 2009.
- CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of different  $\beta$ -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 529-541, 1999.
- CEREZUELA, R.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, p. 243-248, 2009.

- CHAGAS, E. C.; GOMES, L. C.; MARTINS JUNIOR, H.; ROUBACH, R.; LOURENÇO, J. N. P. Desempenho de tambaqui cultivado em tanques-rede, em lagos de várzea, sob diferentes taxas de alimentação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 833-835, 2005.
- CHAGAS, E. C.; LOURENÇO, J. N. P.; GOMES, L. C.; VAL, A. L. Desempenho e estado de saúde de tambaquis cultivados em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. In: URBINATI, E. C.; POSSEBON-CYRINO, J. E. (Ed.). **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**. Jaboticabal, 2003a, p. 83-93.
- CHAGAS, E. C.; MESQUITA-SAAD, L. S. B.; ARIDE, P. H. R.; MENDES, F. A.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Vitamins C, D and E in fish. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Ed.). **Fish Adaptations**. Enfield, NH: Science Publishers, Inc., p. 141-178, 2003b.
- CHAGAS, E. C.; NETO, J. D.; ALEXANDRE, R. O.; SAKABE, R.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. Efeito do  $\beta$ -glucano sobre o crescimento e desafio com *Aeromonas hydrophila* em tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 10., 2008, Búzios. *Anais*. Búzios: ABRAPOA.
- CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Ascorbic acid reduces the effects of hypoxia on the Amazon fish tambaqui. **Journal of Fish Biology**, London, v. 69, p. 608-612, 2006.
- CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 397-402, 2003.
- CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T.E.H.P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 132-225.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes médicas. 1996.
- CHOUDHURY, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, S.; DAS, S. S.; MUKHERJEE, S. C. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 281-91, 2005.
- CIPRIANO, R. C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Fish Disease Leaflet. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research Washington, 68, 2001.
- COOK, M.T., HAYBALL, P.J., HUTCHINSON, W., NOWAAK, B.F., HAYBALL, J.D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed

supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v.14, p. 333-345, 2003.

COSGROVE, M. Nucleotides. **Nutrition**, v. 14, p. 748-751, 1998.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggest a role for granulocytes as antigen-presenting cells. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 1275–1285, 2006.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; ORTUNO, J.; MESEGUER, J. Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 293-302, 2001.

DALMO, R. A.; BOGWALD, J.  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p. 384-396, 2008.

DALMO, R. A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, p. 241-73, 1997.

DILUZIO, N.R. Update on the immunomodulating activities of glucans. **Springer Seminar Immunopathology**, v. 88, p. 387-400, 1985.

DOOLEY, J. S. G.; TRUST, T. J. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-layer protein. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 499-506, 1988.

DUARTE, R. M.; MENEZES, A. C. L.; SILVEIRA RODRIGUES, L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Copper sensitivity of wild ornamental fish of the Amazon?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 693-698, 2009.

ELLIS, A. E. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-39, 2001.

ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B. (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications, 1990. p. 101-103.

ENDREAS, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V. E.; GEORGILIS, K.; LONEMANN, G.; VAN DER MEER, J. M. V.; CANNOM, J. G.; ROGERS, T. S.; KLEMPNER, M. S.; WEBER, P. C.; SCHAEFFER, E. J.; WOLFF, M. S.; DINARELLO, C. A. The effect of dietary supplementation with  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cell. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 265-271, 1989.

- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, E.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, p. 287-297, 1992.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v.17, p.319-330, 1993.
- ESTEVE, C.; AMARO, C.; GARAY, E.; SANTOS, Y.; TORANZO, A. E. Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 555-562, 1995.
- ESCH, G. W.; HAZEN, T. C. Stress and body condition in a population of largemouth bass, implications for red-sore disease. **Transamerican Fish Society**, v. 109, p. 532-536, 1980.
- FAGUNDES, M.; URBINATI, E. C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v. 276, p. 112-119, 2008.
- FALCON, D. R. **Nível de suplementação de 1,3 β-glucano e vitamina C em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos**. 2007. 146 f. Tese – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- FLAJNIK, M. F.; DU PASQUIER, L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? **Trends in Immunology**, v. 25, p. 640–644, 2004.
- FRITZ, J. H.; LE BOURHIS, L.; MAGALHAES, J. G.; PHILPOTT, D. J. Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. **Trends in Immunology**, v. 29, p. 41–49, 2007.
- FUENTES, R. J. M.; PEREZ, H. J. A. Isolation of *Aeromonas hydrophila* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinaria**, v.29, p.117-119, 1998.
- GARCIA, F.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Challenge of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed diets supplemented with vitamins C and E by *Aeromonas hydrophila* under different temperature. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 378-385, 2009.
- GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, p. 39-46, 2007.
- GARCIA-LEME, J. **Hormones and Inflammation**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 238 p.
- GATLIN III, D. M. Nutrition and fish health. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish Nutrition**. Elsevier, p. 671-701, 2002.

- GATLIN III, D. M.; LI, P. Nucleotides. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. (Ed.). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. UK: Cromwell Press, p. 193-209, 2007.
- GERRY, J. **Characoids of the world**. New Jersey, USA: T.F.H. Pub. In. 1977. 672 p.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, B.M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.
- GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 3, S1-S4, 2002.
- GOMES, L. C.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 283-290, 2003.
- GOMES, L. C.; BRANDÃO, F. R.; CHAGAS, E. C.; FERREIRA, M. F. B.; LOURENÇO, J. N. P. Efeito do volume do tanque-rede na produtividade de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 111-113, 2004.
- GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R.; COPPATI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v. 256, p. 521-528, 2006.
- GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; BERGOT. P.; KAUSHIK, S. J. Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, p. 453-461, 1998.
- GOULDING , M.; CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, n. 1, p. 107-133,1982.
- GOULDING, M. **The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history**. Los Angeles: University of California Press, Los Angeles. 200 p. 1980.
- GRIMBLE, G. K.; WESTWOOD, O. M. R. Nucleotides. In: GERMAN, J. B.; KEEN, C. L. (Ed.). **Nutrition and Immunology: Principles and practice**. Totowa, NJ, USA, Humana Press Inc., p. 135-144, 2000.
- GRINDE, B. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. **Journal of Fish Diseases**, v. 12, p. 95-104, 1989.
- GROVE, S.; JOHANSEN, R.; DANNEVIG, B.H.; REITAN, L.J.; RANHEIM, T. Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 53, p. 211–221, 2003.



- GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 203-212, 1999.
- GUIMARÃES, I. **Vitamina A em dietas para tilápia do Nilo**. 2009. 92 f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 92p.
- GUZMAN-MURILLO, M. A.; MERINO-CONTRERAS, M. L.; ASCENCIO, F. Interaction between *Aeromonas veronii* and epithelial cells of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in culture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 897-906, 2000.
- HAZEN, T. C., FLIERMANS, C. B., HIRSCH, R. P. Prevalence and distribution of *Aeromona hydrophila* in the United States. **Applied Environmental Microbiology**, v. 36, p. 731–738, 1978.
- HOLLAND, M. C.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 399-420, 2002.
- HONDA, E. M. S. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação de tambaqui, *Colossoma bidens* (Spix). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 4, p. 47-53, 1974.
- HUIZINGA, H. W.; ESCH, G. W.; HAZEN, T. C. Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). **Journal of Fish Diseases**, v.2, p.263-277, 1979.
- INGRAM, G. A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection - a review. **Journal of Fish Biology**, v. 16, p. 23-60, 1980.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Produção brasileira da Aqüicultura Continental, por Estado e espécie, para o ano de 2005**: Estatística da Aqüicultura e Pesca no Brasil – Ano 2005. Brasília: SEAP, 2005. 101 p.
- IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. San Diego: Academic Press. 1996.
- IZEL A. C. U.; MELO, L. A. S. **Criar matrinxã: atividade econômica potencial para o agronegócio amazonense**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2004. 22 p.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 332-344, 1998.
- JANEWAY, C.A; TRAVERS, P.; HUNT, P.; WALPORT, M. **Immunobiology** - The immune system in health and disease. N.York, USA: Garland Publ., 1997.

- JARAMILLO, F. Jr.; GATLIN, D. M. III. Comparison of purified and practical diets supplemented with or without  $\beta$ -glucan and selenium on resistance of hybrid striped bass to *Streptococcus iniae* infection. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 35, p. 245-252, 2004.
- JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v. 154, p. 1-15, 1997.
- JENEY, Z. S.; JENEY, G. Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 129, p. 397-420, 1995.
- JONES, S. R. M. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 841–852, 2001.
- JORGENSEN, J. B.; ROBERTSEN, B. Yeast beta-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo Salar* L) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 43–57, 1995.
- JORGENSEN, J.B.; SHARP, J.E.; SECOMBES, C.J.; ROBERSEN, B. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, p. 267-277, 1993.
- KAMILYA, D.; MAITI, T. K.; JOARDAR, S. N.; MAL, B. C. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 331-337, 2006.
- KARUNASAGAR, G. M.; ROSALIND, G. M.; KARUNASAGAR, I. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. **Fish & Shellfish Immunology**, v.3, p. 413-417, 1993.
- KARUNASAGAR, I.; ROSALIND, G. M.; KARUNASAGAR, I.; RAO, K. G. *Aeromonas hydrophila* septicemia of Indian major carps in some commercial fish farms of West Godavari district, Andhra Pradesh. **Current Science**, v. 18, p. 1044–1045, 1989.
- KINOSHITA, T. Biology of the complement: the overture. **Immunology Today**, v. 12, n. 9, p. 291-95, 1991.
- KIROV, S. M.; TASSELL, B. C.; SEMMLER, A. B. T.; O DONOVAN, L. A.; RABAAN, A. A.; SHAW, J. G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* Species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 547-555, 2002.
- KOZINSKA, A.; FIGUERAS, M. J.; CHACON, M. R.; SOLER, L. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 1034-1041, 2002.

- KOZINSKA, A.; GUZ, L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 437-445, 2004.
- LEONARDI, M.; SANDINO, A. M.; KLEMPAU, A. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 23, p. 52-59, 2003.
- LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 2, p. 53-79, 1999.
- LI, P.; GATLIN III, D. M. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v. 251, p. 141-152, 2006.
- LI, P.; LEWIS, D. H.; GATLIN III, D. M. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 561-569, 2004.
- LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 6, p. 1-5, 1989.
- LIN, Y. H.; SHIAU, S. Y. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. **Aquaculture**, v. 248, p. 235-244, 2005.
- LIN, Y. H.; WANG, H.; SHIAU, S. Y. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v. 15, p. 117-122, 2009.
- LÓPEZ-NAVARRO, A. T.; GIL, A.; SÁNCHEZ-POZO, A. Deprivation of dietary nucleotides results in a transient decrease in acid-soluble nucleotides and RNA concentration in rat liver. **Jornal of Nutrition**, v. 125, p. 2090-2095, 1995.
- LOW, C.; WADSWORTH, S.; BURRELS, C.; SECOMBES, C. J. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. **Aquaculture**, v. 221, p. 23-40, 2003.
- MACMILLAN, J. Infectious diseases. In: TUCKER, C. S. (Ed.). **Channel catfish culture**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, p. 405-496, 1985.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137-151, 2006.

- MAITA, M. Fish health assessment. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D.M. (Ed.). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. UK: Cromwell Press, p. 10-34. 2007.
- MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* GOLVAN, 1956, (EOACANTHOCEPHALA, NEOECHINORHYNCHIDAE) em tambaquis jovens, *Collossoma macropomum* (CUVIER, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001.
- MARCON, J.L.; CHAGAS, E.C.; KAVASSAKI, J.M.; VAL, A.L. Intra-erythrocytic phosphates in 25 fish species of the Amazon: GTP as a key factor in the regulation of Hb-O<sub>2</sub> affinity. In: VAL, A. L.; VAL, V. M. F. de A. (Ed.). **Biology of tropical fishes**. Manaus: INPA, 1999. p.229-240.
- MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; MORAES, F. R.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W. B.; MOURINO, J. L. P. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. **Ciência Rural**, v. 38, p. 213-218, 2008.
- McDONALD, D. G.; MILLIGAN, C. L. Ionic, osmotic and acidbase regulation in stress. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p.119-144.
- MCGUINNESS, D. H.; DEHAL, P. K.; PLEASS, R. J. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. **Trends in Parasitology**, v. 15, p. 312–319, 2003.
- MEDZHITOV, J. R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, p. 819–826, 2007.
- MELO, L.A.S.; IZEL, A.C.U.; RODRIGUES, F.M. **Criação de tambaqui (*Collossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas**. Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 25p.
- MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHEL, S.; TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.157-168, 1995.
- MEYDANI, S. N.; ENDRES, S.; WOODS, M. M.; GOLDIM, B. R.; SOO, C.; MORRILL-LABRODE, A.; DINARELLO, C. A.; GORBACH, S. L. Oral (n-3) fatty acids supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. **Jornal of Nutrition**, v. 121, p. 547-555, 1991.

- MISRA, C. K.; KUMAR, B. D.; MUKHERJEE, S. C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 82–94, 2006.
- MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 625-723.
- MURRAY, C. K.; FLETCHER, T. C. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. **Journal of Fish Biology**, v.9, p.329-334, 1976.
- NAYAK, D. K.; ASHA, A.; SHANKAR, K. M.; MOHAN, C. V. Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus* – a carnivore model. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, p. 613-619, 2004.
- NIKL, L.; EVELYN, T.P.T.; ALBRIGHT, L.J. Trials with an orally and immersion-administered beta-1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 17, p. 191-196, 1993.
- NOGA, E. J. The importance of *Learanea cruciata* (LeSeuer) in the initiation of skin lesions in largemouth bass *Micropterus salmonides* (Lacepede) in the Chowan River, North Carolina, **Journal of Fish Diseases**, v.9, p. 295-302, 1986.
- OLIVEIRA, S. R. **Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse de transporte do matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. 2008. Dissertação - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.
- ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. High dietary intake of tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, p. 293-307, 2000.
- PABLO, M. A.; PUERTOLLANO, M. A.; CIENTIFUEGOS, G. V. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune functions. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 945-950, 2002.
- PALAKSHA, K. J.; SHIN, G. W.; KIM, Y. R.; JUNG, T. S. Evaluation of nonspecific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, p. 479–488, 2008.
- PARSLOW, T. G.; BAINTON, D.F. Imunidade inata. In: PASLOW, T.G.; STITES, D.P.; TERR, A.I.; IMBODEN, J.B. (Eds.). **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 16-33.
- PARSLOW, T.G. **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

- PAULSEN, S. M., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast  $\beta$ -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 23-37, 2001.
- PAULSEN, S. M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. *In vivo* effects of  $\beta$ -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, p. 39-54, 2003.
- PEARCE, J.; HARRIS, J. E.; DAVIES, S. J. The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, p. 337-340, 2003.
- PILARSKI, F. **Imunização de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com antígeno obtido de *Flavobacterium columnare* e suplementação alimentar com vitamina C**. 2006. 118p. Tese– Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- PILARSKI, F.; CHAGAS, E. C.; VARANDAS, D. N.; SAKABE, R. 2009. Effect of  $\beta$ -glucan supplementation in the juvenile *Oreochromis niloticus* vaccinated against *Flavobacterium columnare*: non-specific immune parameters. In: WORLD AQUACULTURE, 2009. Veracruz. **Anais**. Veracruz: WORLD AQUACULTURE SOCIETY.
- RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: CRUZ -SUÁREZ, L.E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., OLVERA-NOVOA, M.A.; CIVERA-CERECEDO, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán, Mexico, 2000.
- RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, p. 229-288, 1996.
- RAMADAN, A.; ATEF, M. Effect of the biogenic performance enhancer (Ascogen “S”) on growth rate of tilapia fish. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 87, p. 304-306, 1991.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.
- ROBERTS, R. J. The immunology of teleost. In: **Fish Pathology**. London: Bailliere Tindall, 1989, p.135-150.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.E.; JORGENSEN, J.B.  $\beta$ -glucans as immunostimulators in fish. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T. (Eds.). **Modulators of Fish Immune Responses**. Fair Haven, VT, SOS Publications, p. 83-99, 1994.
- ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, p. 391-400, 1990.

- RODRIGUES, A. P.; HIRSCH, D.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LOGATO, P. V. R.; MORAES, A. M. Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 638-643, 2006.
- ROSS, L.G., ROSS, B. **Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Oxford, UK: Blackwell Science, 176p, 1999.
- RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K.; SUNDE, J.; BERG, A. E.; NORDGARDEN, U.; FJELLDAL, P. G.; OPPEDAL, F. Digestive efficiency, free amino acid pools and quality of growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected by light regimes and vaccine types. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 255-272, 2009.
- SAINT-PAUL, U. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminidae. **Environmental Biology of Fishes**, v. 11, p. 53-62, 1984.
- SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American fresh water fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.
- SAKABE, R. **Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho**. 2007. 78 f. Dissertação - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP.
- SAKAI, M. Current research status of immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.
- SAKAI, M.; TANIGUCHI, K.; MAMOTO, K.; OGAWA, H.; TABATA, M. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, p. 433-438, 2001.
- SANTARÉM, M.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Effects of  $\beta$ -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 7, p. 429-437, 1997.
- SCHORER, M. **Utilização do  $\beta$ -glucano sobre o desempenho produtivo, indicadores de estresse, perfil hematológico e sobrevivência do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 96 f. Dissertação – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- SEALEY, W. M.; BARROWS, F. T.; HANG, A.; JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K.; LAPATRA, S. E.; HARDY, R. W. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of  $\beta$ -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 115-28, 2008.
- SECOMBES, C. J. The in vitro formulation of teleost multinucleate giant cells. **Journal of Fish Diseases**, v. 8, p. 461-464, 1985.

- SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: cellular defences. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Eds.), **The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment**. San Diego: Academic Press, p. 63–103, 1996.
- SELTMAN, G.; HOLST, O. **The bacterial cell wall**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2002.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Adjuvant and immunostimulatory effects of  $\beta$ -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 15-24, 2006.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function and infection with *Aeromonas hydrophila*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 57, n. 1, p. 39-48, 2005.
- SHAO, L.; SERRANO, D.; MAYER, L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. **Seminars in Immunology**, v. 13, p. 163–175, 2001.
- SHELDON, W. M. Jr.; BLAZER, V. S. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophage. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 3, p. 87-93, 1991.
- SHERWOOD, E. R.; WILLIAMS, D. L.; McNAME, R. B.; JONES, E. L.; BROWDER, I. W.; DI LUZIO, N. R. Enhancement of interleukin-1 and interleukin-2 production by soluble glucan. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 9, p. 261-267, 1987.
- SHOEMAKER, C. A.; KLESZIUS, P. H.; LIM, C. Immunity and disease resistance in fish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. (Eds.). **Nutrition and Fish Health**. Binghamton, NY, USA: Haworth Press, p. 149-162, 2001.
- SILVA, C. M. A. **Bactérias gram-negativas isoladas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas-Brasil**. 2001. 66 f. Dissertação - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas.
- SILVA, C.; GOMES, L.; BRANDAO, F. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. **Aquaculture**, v. 264, p. 135-139, 2007.
- SILVA, D. A.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 983-990, 2003.
- SILVA, J. A. M. **Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidos pelo Tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) nas florestas**



- inundáveis da Amazônia Central**. 1996. 142 f. Tese - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas.
- SINK, T. D.; NEAL, J. W. Stress response and posttransport survival of Hybrid Striped Bass transported with or without clove oil. **North American Journal of Aquaculture**, v. 71, p. 267-275, 2009.
- SIWICKI, A. K.; ZAKES, Z.; TERECH-MAJEWSKA, E.; KOWALSKA, A.; MALACZEWSKA, J. Supplementing the feed of pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)] juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 405-411, 2009.
- SMITH, N.J.H. **A pesca no rio Amazonas**. INPA, Manaus. 154 p. 1979.
- SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 71-90, 2003.
- STOREBAKKEN, T.; GOSWAMI, U.C. Plasma carotenoid concentration indicates the availability of dietary astaxanthin for Atlantic salmon, *Salmon salar*. **Aquaculture**, v. 146, p. 147-153, 1996.
- TACHIBANA, K.; YAGI, M.; HARA, K.; MISHIMA, T.; TSUCHIMOTO, M. Effects of feeding b-carotene supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae of Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*) and Spotted parrotfish (*Oplegnathus punctatus*): preliminary trials. **Hydrobiologia**, v. 358, p. 313-316, 1997.
- TAKAHASHI, L. S.; ABREU, J. S.; BILLER, J. D.; URBINATI, E. C. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. **Acta Scientiarum**, v. 28, p. 469-475, 2006.
- TAKEMURA, A.; TAKANO, K. Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 14, p. 415– 521, 1995.
- TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S. B.; JERÔNIMO, G. T.; SANT'ANA, A. R. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN-NETO, M.; POZZOBON-SORIA, W. S. (Eds.). **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009, p. 43-72.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, 143 p. 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf.), with an assessment of morphological,

- cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, p. 49-54, 2007.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M. L. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in freefishing from France, São Paulo, Brazil. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v. 34, p. 189-196, 2008.
- TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, p. 709-712, 2007.
- TERR, A.I. Inflamação. In: PASLOW, T.G.; STITES, D.P.; TERR, A.I.; IMBODEN, J.B. (Eds.). **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 163-175.
- THOMPSON, K. D.; TATNER, M. F.; HENDERSON, R. J. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. **Aquaculture Nutrition**, v. 2, p. 21-31, 1996.
- TORANZO, A. E.; BAYA, A. M.; ROMALDE, J. L.; HETRICK, F. M., Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesueur. **Journal of Fish Diseases**, v. 12, p. 439-448, 1989.
- TRUST T. J.; ISHIGURO E. E.; ATKINSON H. M. Relationship between *Haemophilus piscium* and *Aeromonas salmonicida* revealed by *Aeromonas hydrophila* bacteriophage. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, p. 199-201, 1980.
- URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Sodium chloride added to transport water and physiological responses of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae). **Acta Amazônica**, v. 36, p. 569-572, 2006.
- URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrinxã to the stress of transport under influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 16, n. 1, p. 75-85, 2001.
- VAINIKKA, A.; JOKINEN, E.I.; KORTET, R.; PAUKKU, S.; PIHONEN, J.; RANTALA, M.J.; TASKINEN, J. Effects of testosterone and  $\beta$ -glucan on immune functions in tench. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 348-361, 2005.
- VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the Amazon and their Environment. Physiological and Biochemical Aspects**. Springer, Heidelberg. 224p. 1995.
- VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, v. 33, p. 107-114, 1998.

- VERAKUNPIRIYA, V.; WATANABE, K.; MUSHIAKE, K.; KAWANO, K.; KOBAYASHI, T.; HASEGAWA, I.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Effect of krill meal supplementation in soft-dry pellets on spawning and quality of egg of yellowtail. **Fisheries Science**, v. 63, p. 433-439, 1997.
- VERLHAC, V., GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. Brochure n° 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.
- VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHUEP, W., HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 409-424, 1998.
- VIVAS, J.; CARRACEDO, B.; RIAÑO, J.; RAZQUIN, B. E.; LÓPEZ-FIERRO, P.; ACOSTA, F.; NAHARRO, G.; VILLENA, A. J. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2702-2708, 2004.
- WEDEMEYER, G.A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C. B (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, p.35-72, 1997.
- WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. Chapman & Hall, New York, 1996.
- WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell or yeast subcomponents. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 24-35, 2007.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.
- WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIUS, P. H. Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, p. 217-25, 2005.
- WHYTE, S. K. The innate immune response in finfish: a review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, 1127-1151, 2007.
- YAMAMOTO, S.; WANG, M. F.; ADJEI, A. A.; AMEHO, C. K. Role of nucleosides and nucleotides in the immune system, gut reparation after injury, and brain function. **Nutrition**, v. 13, p. 372-374, 1997.

- YAMASHITA, H.; FUJITA, Y.; KAWAKAMI, H.; NAKAI, T. The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). **Fish Pathology**, v. 40, p. 15–21, 2005.
- YAMASHITA, H.; MORI, K.; KURODA, A.; NAKAI, T. Neutralizing antibody levels for protection against betanodavirus infection in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), immunized with an inactivated virus vaccine. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 767-775, 2009.
- YANO, T. The non-specific immune system. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment**. San Diego, California: Academic Press, p. 105-157, 1996.
- YAQOOB, P.; CALDER, P. C. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell derived cytokines. **Cytokine**, v. 7, p. 548-557, 1995.
- YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. **Immunology Letters**, v. 41, p. 241-247, 1994.
- YOO, G.; LEE, S.; KIM, Y. C.; OKORIE, O. E.; PARK, G. J.; HAN, Y. O.; CHOI, S. M.; KANG, J. C.; SUN, M.; BAI, S. Effects of dietary  $\beta$ -1,3 glucan and feed stimulants in juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 138-145, 2007.
- YOUSIF, A. N.; ALBRIGHT, L. J.; EVELYN, T. P. T. Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 10, p. 45– 49, 1991.
- YOUSIF, A.N.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T. P T. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 19, p. 15-9, 1994.
- ZAPATA, A.; AMEMIYA, C. T. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. Origin and evolution of the vertebrate immune system. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 248, p. 67–107, 2000.
- ZAPATA, A.; DIEZ, B.; CEJALVO, T.; GUTIERREZ-DE FRIAS, C.; CORTES, A. Ontogeny of the immune system of fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 126–136, 2006.

## **Objetivo geral**

Este estudo teve por objetivo avaliar a eficácia dos imunoestimulantes  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui (*Colossoma macropomum*) com base no desempenho produtivo e resistência frente ao desafio bacteriano, nas respostas fisiológicas de estresse e na eficácia de uma vacina contra *Aeromonas hydrophila*.

## **Objetivos específicos**

1. Avaliar o emprego dos imunoestimulantes  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui sobre o desempenho produtivo, respostas fisiológicas, imunológicas e resistência frente ao desafio com *Aeromonas hydrophila*.

2. Avaliar as respostas fisiológicas de estresse de tambaquis alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos após transporte em sistema fechado.

3. Avaliar a eficácia de uma vacina contra *Aeromonas hydrophila* para juvenis de tambaqui alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano.

## **CAPÍTULO II**

**Desempenho produtivo, respostas fisiológicas e desafio com *Aeromonas hydrophila* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos**

## RESUMO

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é a espécie mais criada na região Norte do Brasil em diferentes sistemas de criação intensiva e a suplementação de imunostimulantes na dieta dessa espécie é vista como alternativa para incrementar as respostas específicas e não específicas de defesa desses animais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o emprego dos imunostimulantes  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui sobre o desempenho produtivo, respostas fisiológicas, imunológicas (concentração e atividade de lisozima, e atividade respiratória de leucócitos) e resistência frente ao desafio com *Aeromonas hydrophila*. Para isto, foram utilizados 297 peixes ( $29,45 \pm 0,80$  g;  $12,02 \pm 0,12$  cm) em dois diferentes experimentos. No experimento I avaliou-se o emprego de  $\beta$ -glucano (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%  $\text{kg}^{-1}$  dieta) e no experimento II o emprego de nucleotídeos (0; 0,2 e 0,5%  $\text{kg}^{-1}$  dieta). Após 60 dias foi avaliado o desempenho produtivo e então os peixes foram desafiados com *A. hydrophila*, sendo avaliados os parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos antes e após o desafio bacteriano. Os resultados deste estudo mostram que a suplementação de  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui por 60 dias não teve influência sobre o desempenho produtivo. Após a realização do desafio bacteriano pode-se caracterizar a ocorrência de anemia normocítica-normocrômica (experimento I -  $\beta$ -glucano) e anemia macrocítica-hipocrômica (experimento II – nucleotídeos), sendo observado ainda que a suplementação com  $\beta$ -glucano não alterou a concentração e atividade de lisozima e a de nucleotídeos promoveu redução na atividade respiratória de leucócitos nos tambaquês. Entretanto, a menor suplementação dos imunostimulantes (0,1% de  $\beta$ -glucano e 0,2% de nucleotídeos) foi eficiente em garantir maior sobrevivência para a espécie quando desafiada com *Aeromonas hydrophila*.

Palavras chave: Tambaqui, imunostimulantes, *Aeromonas hydrophila*.

## ABSTRACT

The *Colossoma macropomum* is the most farmed species in the north region of Brazil in intensive system. The immunostimulant supplementation in the species diet can be an alternative to increase the specific and non-specific immune defenses of this fish. The aim of this study was to evaluate the use of the immunostimulants  $\beta$ -glucan and nucleotides in the tambaqui diet on the productive performance, physiological and immunological responses (concentration and activity of lysozyme, and respiratory burst of leucocytes) and resistance to *Aeromonas hydrophila* challenge. A total of 297 fish ( $29.45 \pm 0.80$  g;  $12.02 \pm 0.12$  cm) were used in two experiments. Experiment I tested different  $\beta$ -glucan concentrations (0; 0.1; 0.2; 0.4 and 0.8%  $\text{kg}^{-1}$  diet) and experiment II different nucleotide concentrations (0; 0.2 and 0.5%  $\text{kg}^{-1}$  diet). After 60 days the productive performance was evaluated and fish were challenged with *A. hydrophila*. Hematological, biochemical and immunological parameters were determined before and after the bacteria challenge. The results this study indicated that the  $\beta$ -glucan and nucleotide dietary supplementation for 60 days had no influence on the productive performance. After the challenge was observed normocytic-normocromic anemia (first experiment with  $\beta$ -glucan) and macrocytic-hipocromic anemia (second experiment with nucleotide). The  $\beta$ -glucan supplementation did not change the lysozyme concentration and activity and the nucleotide supplementation promoted the reduction of the oxidative burst of leukocytes in tambaquis. The lowest concentrations of both immunostimulants (0.1%  $\beta$ -glucan and 0.2% nucleotide) were effective to ensure higher survival rates of tambaqui when challenged with *Aeromonas hydrophila*.

Key words: Tambaqui, immunostimulants, *Aeromonas hydrophila*.



## Introdução

A criação de espécies nativas vem crescendo nos últimos anos e, no caso do tambaqui (*Colossoma macropomum*), sua criação tem se expandido nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (IBAMA, 2005) devido ao seu excelente potencial para produção intensiva, principalmente pela fácil obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e excelente utilização de alimentos (Saint-Paul, 1986; Val et al., 1998; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Melo et al., 2001; Araújo-Lima & Gomes, 2005). É a espécie mais criada na região Norte do Brasil (IBAMA, 2005), alcançando 3 kg de peso após 12 meses em sistemas de viveiros/barragens (Melo et al., 2001; Araújo-Lima & Gomes, 2005). Contudo, um dos principais problemas relacionados à sua criação é a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Malta et al., 2001; Silva, 2001), sendo a bactéria *Aeromonas hydrophila* um dos problemas na criação de peixes de água doce.

Nos sistemas de criação intensiva, os peixes são expostos continuamente a alterações na qualidade da água e a práticas de manejo, tais como: manuseio excessivo, transporte e adensamento, que induzem respostas de estresse, com consequências negativas sobre o desempenho produtivo, resposta imune e resistência dos peixes a doenças (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2000; Barton et al., 2000; Brandão et al., 2006).

Nesses sistemas criação, o uso de quimioterápicos e antibióticos tem aumentado em função da elevada ocorrência de doenças parasitárias e infecciosas (Pilarski & Sakabe, 2009). Entretanto, o seu uso indiscriminado ocasiona problemas como o desenvolvimento de bactérias resistentes, presença de resíduos de antibióticos nos tecidos de peixes comercializados e o impacto negativo no ambiente (Buchman et al., 1992; Grant & Briggs, 1998; Smith et al., 2003; Sorum, 2006). Assim, o emprego das boas práticas de manejo (BPMs) vem sendo realizado (Boyd & Queiroz, 2004), com o uso de imunostimulantes (Sakai, 1999; Li & Gatlin III, 2006; Dalmo & Bogwald, 2008).

Os imunostimulantes são substâncias biológicas que podem incrementar as respostas específicas e não específicas de defesa dos animais (Raa, 1996; Verlhac et al., 1998; Vainikka et al., 2005; Chagas et al., 2009). Os efeitos benéficos dos imunostimulantes consistem em aumentar a atividade de macrófagos, fagocitose por neutrófilos e monócitos e maior produção de linfócitos, imunoglobulinas e lisozima (Sakai, 1999), aumentando a resistência desses animais frente à infecção por organismos oportunistas (Erdal et al., 1991; Raa, 1996; Verlhac et al., 1998; Sakai, 1999; Amar et al., 2001; Vainikka et al., 2005). Dentre estes compostos destacam-se os glucanos e os nucleotídeos.

Os glucanos são macromoléculas formadas por blocos de glicose unidos por meio de ligações  $\beta$  (1-3) e  $\beta$  (1-6), sendo normalmente encontrados nas células de levedura e fungos e funcionam como imunoestimulante em mamíferos (DiLuzio, 1985) e em peixes (Robertsen et al., 1990; Cook et al., 2003). Nos peixes, o  $\beta$ -glucano pode favorecer a estimulação dos mecanismos de defesa não-específicos, estimulando a atividade fagocitária dos macrófagos e aumentando assim sua capacidade de defesa contra patógenos (Jorgensen et al., 1993; Jorgensen & Robertsen, 1995; Cook et al., 2003), além de incrementar a produção de prodeínas líticas como a lisozima e as do sistema complemento (Engstad et al., 1992; Paulsen et al., 2001). De forma semelhante, a suplementação de nucleotídeos nas dietas dos peixes influencia as respostas imunes e aumenta a resistência a doenças (Burrels et al., 2001; Leonardi et al., 2003; Low et al., 2003). Em salmonídeos essa suplementação aumentou a resistência dos peixes a infecções virais, bacterianas e parasitárias, e ainda melhorou a eficácia da vacinação e a capacidade osmorregulatória (Burrels et al., 2001).

Os efeitos benéficos do  $\beta$ -glucano e nucleotídeos são relatados em diferentes espécies de peixes (Ramadan & Atef, 1991; Adamek et al., 1996; Cook et al., 2003; Misra et al., 2006; Ai et al., 2007; Sealey et al., 2008; Dalmo & Bogwald, 2008). Contudo, pesquisas avaliando o potencial desses suplementos a base de glucanos e nucleotídeos em peixes nativos brasileiros são limitadas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o emprego dos imunoestimulantes  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui sobre o desempenho produtivo, respostas fisiológicas, imunológicas e resistência frente ao desafio com *Aeromonas hydrophila*.

## **Material e Métodos**

Este estudo foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal, SP, no Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos.

### **Dietas experimentais**

Oito dietas práticas foram preparadas contendo 28% de proteína bruta (PB), sendo cinco dietas com  $\beta$ -glucano e três dietas com nucleotídeos. O percentual dos ingredientes e a composição químico-bromatológica das dietas são apresentados na Tabela 1.

As dietas foram processadas na fábrica de ração do Caunesp. No seu preparo, todos os ingredientes foram moídos (<0,7 mm), pesados e então homogeneizados em misturador manual. Após a mistura, procedeu-se a peletização (Peletizadora CPM Califórnia, Pellet Mill

Co, modelo 20A) e as rações foram secas ao ar durante 24 horas. As rações foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização.

A fonte de  $\beta$ -glucano utilizada foi o produto Betamune® (Biorigin, São Paulo, Brasil) e a de nucleotídeos foi o produto Hilyses® (ICC Ind. Com. Exp. e Imp. Ltda, São Paulo, Brasil), obtidos a partir da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, os quais possuem 80% de atividade para o  $\beta$ -glucano e 23% de atividade para o nucleotídeo, respectivamente.

### **Delineamento experimental e manejo alimentar**

Juvenis de tambaqui ( $n=297$ ; peso médio  $29,45 \pm 0,80$  g e comprimento total  $12,02 \pm 0,12$  cm) foram aclimatados em tanques de 310 L durante 30 dias, onde receberam ração comercial para peixes onívoros com 28% de proteína bruta (PB). Após esse período, os tambaquis foram distribuídos em quinze tanques ( $n=15$ ), compondo cinco tratamentos com três repetições para o  $\beta$ -glucano (experimento I) e em nove tanques ( $n=8$ ) correspondentes a três tratamentos, com três repetições, para os nucleotídeos (experimento II), ambos em delineamento inteiramente casualizado.

Os peixes foram alimentados com a dieta suplementada com a preparação comercial de  $\beta$ -glucano (Betamune®, Biorigin, São Paulo, Brasil) nas concentrações de 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%  $\text{kg}^{-1}$  de dieta ou com a preparação de nucleotídeos (Hilyses®, ICC Ind. Com. Exp. e Imp. Ltda, São Paulo, Brasil) nas concentrações de 0; 0,2 e 0,5%. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente, durante 60 dias. Nesse período, os parâmetros de qualidade de água como temperatura ( $29,60 \pm 0,35^{\circ}\text{C}$ ) e oxigênio dissolvido ( $5,86 \pm 0,44$  mg  $\text{L}^{-1}$ ) foram monitorados três vezes por semana por meio de um monitor YSI 55, e quinzenalmente foram avaliados: alcalinidade ( $192,45 \pm 1,36$  mg  $\text{L}^{-1}$ ) por titulação, pH ( $8,08 \pm 0,11$ ) com um pHmetro Quimis Q400M2 e amônia total ( $0,09 \pm 0,004$  mg  $\text{L}^{-1}$ ) pelo método de endofenol.

### **Desempenho produtivo e desafio bacteriano**

Ao final do período de alimentação, com os peixes previamente anestesiados (100 mg  $\text{L}^{-1}$  de benzocaína), realizou-se o procedimento de biometria para obtenção dos parâmetros de crescimento em peso (g) e comprimento total (cm), sendo calculado a partir destes dados o ganho de peso (peso final - peso inicial), conversão alimentar aparente (alimento consumido/ganho de peso), sobrevivência (%) e fator de condição (peso/comprimento<sup>3</sup>).

**Tabela 1.** Composição percentual dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais.

<b>Ingredientes</b>	<b>0,0 <math>\beta</math>-glucano</b>	<b>0,1 <math>\beta</math>-glucano</b>	<b>0,2 <math>\beta</math>-glucano</b>	<b>0,4 <math>\beta</math>-glucano</b>	<b>0,8 <math>\beta</math>-glucano</b>	<b>0,0 nucleotídeo</b>	<b>0,2 nucleotídeo</b>	<b>0,5 nucleotídeo</b>
Farelo de soja	28,50	28,50	28,50	28,50	28,50	28,50	28,50	28,50
Milho	19,10	19,10	19,10	19,10	19,10	19,10	19,10	19,10
Farinha de peixe	17,20	17,20	17,20	17,20	17,20	17,20	17,20	17,20
Farelo de trigo	24,10	24,10	24,10	24,10	24,10	24,10	24,10	24,10
Quirera de arroz	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
Supl. Vit. e min. <sup>1</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Veículo	3,10	2,96	2,81	2,53	1,96	3,10	2,23	0,93
$\beta$ -glucano <sup>2</sup>	---	0,14	0,29	0,57	1,14	---	---	---
Nucleotídeos <sup>3</sup>	---	---	---	---	---	---	0,87	2,17
<b>Total (%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Composição químico-bromatológica</b>								
Matéria Seca (%)	90,20	90,60	90,20	90,30	90,30	89,80	90,40	90,10
Proteína bruta (%)	26,71	26,87	26,71	26,71	27,20	28,74	30,30	29,78
Extrato etéreo (%)	3,79	3,75	4,00	4,25	4,00	5,25	5,25	5,25
Fibra bruta (%)	5,60	5,20	5,20	5,60	5,60	4,80	4,80	4,40
Matéria mineral (%)	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	10,0	9,0	10,0

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico e mineral (Fri Ribe, níveis/kg do produto): Ácido fólico, 2 mg; Ácido pantotênico, 40 mg; Colina, 300 mg; Cobre, 20 mg; Iodo, 10 mg; Ferro, 200 mg; Manganês, 140 mg; Selênio, 0,29 mg; Vitamina A, 6000 UI; Vitamina B<sub>1</sub>, 12 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 40 mcg; Vitamina B<sub>2</sub>, 16 mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 6 mg; Vitamina C, 466,67 mg; Vitamina D<sub>3</sub>, 6000 UI; Vitamina E, 266, 67 mg; Vitamina K, 12 mg; Zinco, 300 mg; Niacina, 200 mg; Biotina, 0,20 mg.

<sup>2</sup> $\beta$ -glucano (Biorigin): 80,0% de atividade.

<sup>3</sup>Nucleotídeos (ICC Ind. Com. Exp. e Imp. Ltda ): 23,0 % de atividade.

Para realização do desafio bacteriano, ensaios para estabelecimento da DL<sub>50</sub>, dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais, foram conduzidos de acordo com a metodologia proposta por Plumb & Bowser (1983), utilizando as concentrações de 10<sup>5</sup> - 10<sup>9</sup> unidade formadora de colônia (UFC) por peixe, sendo a DL<sub>50</sub> estabelecida em 1,0 x 10<sup>8</sup> UFC.

O desafio bacteriano foi conduzido após 60 dias de alimentação com as dietas teste. Para isso, 21 peixes de cada tratamento com β-glucano (sete por repetição) e 24 peixes de cada tratamento com nucleotídeos (oito por repetição) foram inoculados por meio de injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila*, na concentração de 1,0 x 10<sup>8</sup> UFC, fornecida pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp).

Após o desafio, a mortalidade e a ocorrência de sinais clínicos de aeromoniose foram observados a cada 12 horas durante 15 dias. O diagnóstico de aeromoniose foi feito por meio do isolamento de *A. hydrophila* em cultura pura ou no caso da observação de sinais de aeromoniose, tais como: petéquias hemorrágicas, sufusões na superfície do corpo, distensão da cavidade abdominal, peixes isolados do cardume, coloração enegrecida, hemorragia nas nadadeiras e órgãos internos.

### **Procedimento de coleta e análises fisiológicas**

As amostragens foram realizadas ao final do período de criação e quinze dias após a realização do desafio bacteriano com três peixes de cada repetição (nove peixes de cada tratamento). Para isso, com os peixes previamente anestesiados (100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína), procedeu-se a coleta sanguínea mediante a punção de vasos caudais com o auxílio de seringas sem anticoagulante e o sangue foi separado em quatro microtubos. Em um tubo foi colocado EDTA (anticoagulante) e este sangue foi utilizado para determinação do eritrograma e após centrifugação (3.000 rpm, 10 minutos) o plasma foi utilizado nas determinações de proteína total e albumina. Para obtenção de plasma para a determinação da glicose plasmática, uma alíquota do sangue total foi adicionada em microtubos contendo EDTA fluoretado visando à inibição da glicólise. No terceiro tubo se adicionou heparina para a determinação da atividade respiratória de leucócitos e no quarto tubo não se adicionou anticoagulante para obtenção de soro, o qual ficou em temperatura ambiente por cerca de duas horas para coagulação. O soro foi separado por centrifugação (3.000 rpm, 10 minutos), sendo armazenado a -70 °C visando a determinação da concentração e atividade da lisozima.

### **Análises hematológicas e bioquímicas**

Os parâmetros hematológicos determinados foram hematócrito (Ht), depois da centrifugação do sangue (12.000 rpm, 10 minutos), em tubos microcapilares, e posterior leitura em escala padronizada; concentração de hemoglobina (Hb), segundo o método da cianometa-hemoglobina; e contagem do número de eritrócitos (RBC), realizada em câmara de Neubauer, depois da diluição do sangue em solução de formol citrato. Equações hematimétricas (Acerete et al., 2004) foram utilizadas para determinação das constantes corpusculares, como o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Extensões sanguíneas foram preparadas, secas ao ar e coradas com corante de Rosenfeld, durante 10 minutos. Posteriormente, sob microscopia de luz, foram realizadas as contagens diferenciais de leucócitos e contagem de trombócitos, contando até 200 células. Os leucócitos totais, trombócitos totais e eritrócitos foram quantificados indiretamente nas mesmas extensões contando-se o número de trombócitos, leucócitos e eritrócitos para cada 2000 células.

Os parâmetros bioquímicos determinados foram: glicose sanguínea (GL) pelo método de Trinder, proteínas totais (PT) pelo método de biureto e albumina (AL) pelo método de verde de bromocresol, utilizando-se “kits” comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Os valores de globulinas (GB) foram obtidos por meio de cálculo diferencial e a relação albumina:globulina (AL:GL) foi calculada a partir das concentrações de albumina e globulina.

### **Análise da atividade respiratória de leucócitos**

A análise da atividade respiratória de leucócitos foi realizada segundo metodologia descrita por Anderson & Siwicki (1995) e Biller (2008). Essa metodologia se baseia na determinação das espécies reativas ao oxigênio (EROs) produzidas pela atividade respiratória de macrófagos através de ensaio colorimétrico, o qual baseia-se na redução do corante “*nitroblue tetrazolium*” (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de “*formazan*” (Klein, 1990). Para isso, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL do corante “*nitroblue tetrazolium*” (NBT, Sigma, St Louis, MO, USA), cuja mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25 °C. Após, 50 µL da suspensão foi colocada em tubo de ensaio com 1 mL de n, n-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA), cuja mistura foi centrifugada a 3000g por 5 minutos. Na reação, o corante NBT é reduzido, visto que o DMF promove a lise da parede celular dos leucócitos e solubiliza os grânulos de *formazan*. A densidade óptica

da solução foi determinada em espectrofotômetro (Unico, 2100) no comprimento de onda de 540 nm (Sahoo et al., 2005).

### **Análise da concentração e atividade de lisozima**

As análises da concentração e atividade da lisozima foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP). Estas análises foram determinadas por ensaio turbidimético, segundo Ellis (1990) e adaptada por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreu (2007).

Uma curva padrão utilizando lisozima liofilizada ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) de clara de ovo de galinha nas concentrações de 10, 25, 50, 80, 100 e 150 ng lisozima/ $300\mu\text{L}$ , suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10mg) e 50 ml de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) foi preparada e lida em espectrofotômetro (Beckman DU-70S) em 450 nm, sendo os resultados das diferenças de densidades óticas iniciais e finais utilizados para quantificação das concentrações de lisozima nas amostras.

Inicialmente as amostras de soro foram inativadas, em banho maria a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, visando a inativação das proteínas do sistema complemento, de modo que a ação da lisozima fosse o único fator responsável pela lise do *Micrococcus lysodeikticus*.

As preparações consistiram de  $175\mu\text{L}$  de soro inativado e  $125\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), cuja mistura foi levada ao espectrofotômetro (Beckman DU-70S) para incubação durante dois minutos a  $26^{\circ}\text{C}$ . Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* ( $300\mu\text{L}$ ) foi adicionada à mistura, totalizando um volume final de  $600\mu\text{L}$ , e então foi avaliada a redução da densidade óptica ( $\Delta\text{DO}$ ) em 450nm entre 0,5 e 5,0 minutos a  $26^{\circ}\text{C}$ .

A concentração da lisozima (em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) corresponde a redução da  $\Delta\text{DO}$  para cada volume de amostra avaliada e a atividade da lisozima (em  $\text{U mL}^{-1}$ ) corresponde a quantidade de enzima que produziu, em 450nm, um  $\Delta\text{DO}$  de 0,001/ minuto (Won et al., 2004).

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças obtidas entre as médias dos diferentes tratamentos foram estabelecidas por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Zar, 1999).

## Resultados

### Desempenho produtivo

Os parâmetros de desempenho produtivo de tambaquis alimentados com ração suplementada com 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%  $\beta$ -glucano (experimento I) e com 0; 0,2 e 0,5% de nucleotídeos (experimento II) foram avaliados por 60 dias e não foram observadas diferenças significativas nas variáveis peso e comprimento final (Tabela 2). Entretanto, os melhores resultados foram observados nas concentrações de 0,2 e 0,8 %  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  de dieta (Tabela 2). Nos tratamentos com nucleotídeos, houve tendência de aumento nas concentrações de 0,2 e 0,5 % de nucleotídeo  $\text{kg}^{-1}$  de dieta, com os melhores resultados para a maior concentração (Tabela 2).

O ganho de peso e a conversão alimentar aparente não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de  $\beta$ -glucano e nucleotídeos avaliados neste estudo, seguindo o mesmo padrão apresentado para o peso e comprimento final (Tabela 2). O ganho de peso médio foi superior a 50 g para os tratamentos com  $\beta$ -glucano e superior a 140 g para os tratamentos com nucleotídeos. A conversão alimentar aparente obtida neste estudo variou entre 1,9 e 2,19 para os tratamentos com  $\beta$ -glucano e entre 1,68 e 1,96 para os tratamentos com nucleotídeos; sendo que a conversão mais eficiente foi a do tratamento de 0,8% de  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  de dieta e a do tratamento 0,5% de nucleotídeo  $\text{kg}^{-1}$  de dieta em relação às demais concentrações avaliadas (Tabela 2).

Não houve diferença significativa para o fator de condição e sobrevivência dos juvenis de tambaqui dos diferentes tratamentos com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos (Tabela 2). A sobrevivência média nos tratamentos com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos foi superior a 93% (Tabela 2).



**Tabela 2.** Parâmetros de desempenho produtivo de tambaquis criados durante 60 dias com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos. Os dados são apresentados com média  $\pm$  erro padrão da média.

Parâmetros	Imunoestimulantes							
	Glucano (% kg <sup>-1</sup> de dieta)					Nucleotídeos (% kg <sup>-1</sup> de dieta)		
	0,0	0,1	0,2	0,4	0,8	0,0	0,2	0,5
Peso final (g)	78,78 $\pm$ 2,85a	80,24 $\pm$ 2,83a	86,66 $\pm$ 3,74a	82,90 $\pm$ 3,27a	90,39 $\pm$ 4,23a	170,88 $\pm$ 8,15 a	172,13 $\pm$ 7,61 a	176,09 $\pm$ 8,90 a
Comprimento final (cm)	15,96 $\pm$ 0,18a	16,51 $\pm$ 0,20a	16,72 $\pm$ 0,24a	16,45 $\pm$ 0,25a	16,14 $\pm$ 0,28a	20,87 $\pm$ 0,30 a	20,88 $\pm$ 0,29 a	21,09 $\pm$ 0,31 a
Ganho de peso (g)	52,17 $\pm$ 2,66a	51,7 $\pm$ 4,74a	58,8 $\pm$ 5,99a	52,62 $\pm$ 8,43a	59,58 $\pm$ 3,40a	140,65 $\pm$ 14,78 a	142,48 $\pm$ 8,31 a	147,54 $\pm$ 7,41 a
Conversão alimentar	2,13 $\pm$ 0,15a	2,17 $\pm$ 0,32a	2,03 $\pm$ 0,15a	2,19 $\pm$ 0,41a	1,9 $\pm$ 0,06a	1,96 $\pm$ 0,24 a	1,82 $\pm$ 0,09 a	1,68 $\pm$ 0,07 a
Fator de condição	3,47 $\pm$ 0,06a	3,11 $\pm$ 0,21a	3,35 $\pm$ 0,02a	3,40 $\pm$ 0,13a	3,38 $\pm$ 0,05a	3,96 $\pm$ 0,04 a	3,95 $\pm$ 0,06 a	3,93 $\pm$ 0,06 a
Sobrevivência (%)	100,00 $\pm$ 0,00a	95,57 $\pm$ 4,43a	100,00 $\pm$ 0,00a	93,33 $\pm$ 6,67a	100,00 $\pm$ 0,00a	100,00 $\pm$ 0,00 a	97,92 $\pm$ 2,08 a	93,75 $\pm$ 4,27 a

Em cada linha, médias seguidas da mesma letra, para os tratamentos com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

### Desafio bacteriano

No experimento I com  $\beta$ -glucano observou-se que tambaquis que não receberam a suplementação e os que receberam 0,4 e 0,8% de  $\beta$ -glucano apresentaram maior mortalidade após o desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila* (Tabela 3). Entretanto, o grupo de peixes que recebeu a menor suplementação de  $\beta$ -glucano (0,1%), embora sem diferença estatística significativa, foi o que apresentou menor taxa de mortalidade (Tabela 3).

No experimento II com nucleotídeos as maiores taxas de mortalidade ocorreram entre os peixes alimentados por 60 dias sem a suplementação ou com suplementação de 0,5% de nucleotídeos, quando desafiados com a bactéria *Aeromonas hydrophila* (9,52% nos dois grupos de peixes). Os peixes alimentados com dieta suplementada com 0,2% de nucleotídeos não apresentaram mortalidades até quinze 15 dias após o desafio (Tabela 3).

As primeiras mortes ocorreram após 24 horas do início do desafio bacteriano tanto no experimento I com  $\beta$ -glucano quanto no experimento II com nucleotídeos, quando se pode registrar em ambos os experimentos, com exceção do grupo que recebeu dieta suplementada com 0,2% de nucleotídeos, a ocorrência de sinais de aeromoniose como petéquias hemorrágicas, distensão da cavidade abdominal por ascite, lesões ulcerativas na superfície do corpo, hemorragia nas nadadeiras e órgãos internos, peixes isolados do cardume e coloração enegrecida.

**Tabela 3.** Mortalidade acumulada (%) de tambaquis suplementados com  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos na dieta por 60 dias, após desafio com *Aeromonas hydrophila*.

<b>Imunoestimulantes</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
<b><math>\beta</math>-glucano (%)</b>	
0,0	19,05
0,1	9,52
0,2	14,29
0,4	38,10
0,8	38,10
<b>Nucleotídeos (%)</b>	
0,0	9,52
0,2	0,00
0,5	9,52

### **Análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas**

No experimento I com  $\beta$ -glucano e no experimento II com nucleotídeos não houve alterações significativas nos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média) avaliados em 60 dias e após o desafio bacteriano comparando-se os níveis de suplementação dos imunoestimulantes (Tabelas 4 e 5).

Em relação aos tempos de amostragem, comparando-se os resultados obtidos após o desafio bacteriano com aqueles de 60 dias, observou-se no experimento I com  $\beta$ -glucano redução significativa nos valores de hemoglobina (0; 0,2; 0,4 e 0,8%) e hemoglobina corpuscular média (0,8%), além de uma redução numérica do hematócrito e do número de eritrócitos em todos os tratamentos com  $\beta$ -glucano (Tabela 4). No experimento II com nucleotídeos houve aumento significativo no hematócrito (0; 0,2 e 0,5%) e volume corpuscular médio (0,5%), bem como redução significativa nos valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (0 e 0,5%) comparando-se os resultados do desafio bacteriano com os de 60 dias, e embora sem diferença estatística, observou-se, ainda, redução da concentração de hemoglobina e do número de eritrócitos (Tabela 5).

A suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta do tambaqui por 60 dias não exerceu efeito significativo sobre a leucometria global e trombometria global (Tabela 4). Entretanto, com relação aos leucócitos totais, observou-se redução, embora sem diferença estatística significativa, no número de leucócitos totais no grupo alimentado com dieta suplementada com 0,2% de  $\beta$ -glucano em relação aos demais tratamentos (Tabela 4). Para os trombócitos totais, os menores valores foram observados no grupo isento da suplementação com  $\beta$ -glucano (Tabela 4).

Após a realização do desafio com *Aeromonas hydrophila* observou-se que independente do nível de  $\beta$ -glucano suplementado na dieta do tambaqui, estes não exerceram efeito significativo sobre os leucócitos e trombócitos totais (Tabela 4). Para os leucócitos totais dos tratamentos 0,2 e 0,8% de  $\beta$ -glucano, observou-se um aumento significativo em seus valores quando comparados com aqueles antes do desafio bacteriano (Tabela 4) e para os trombócitos totais, de forma inversa, houve uma tendência destes valores serem menores em relação aqueles observados antes do desafio com *A. hydrophila* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos de tambaquis após suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias e 15 dias após o desafio bacteriano.

Parâmetros	Tempos de amostragem	$\beta$ -Glucano (% kg <sup>-1</sup> dieta)				
		0,0	0,1	0,2	0,4	0,8
Ht (%)	60 dias	28,13±1,53aA	31,22±2,38aA	29,00±4,09aA	31,00±4,22aA	33,71±3,92aA
	Desafio	25,56±1,84aA	23,33±2,52aA	25,00±2,60aA	25,22±1,95aA	21,78±2,30aA
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	60 dias	7,54±0,52aA	7,51±0,67aA	7,71±0,51aA	7,86±0,41aA	7,75±0,35aA
	Desafio	5,09±0,56aB	6,33±0,51aA	5,29±0,67aB	6,41±0,47aB	5,19±0,50aB
RBC (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	60 dias	2,16±0,21aA	2,48±0,32aA	2,17±0,25aA	2,69±0,45aA	2,49±0,27aA
	Desafio	1,81±0,19aA	1,84±0,22aA	1,72±0,19aA	2,14±0,26aA	2,06±0,20aA
VCM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	60 dias	136,98±15,18aA	151,62±18,97aA	148,71±20,49aA	141,36±25,39aA	148,38±24,46aA
	Desafio	149,47±14,35aA	143,37±23,46aA	153,97±17,47aA	136,38±20,90aA	109,58±9,18aA
HCM (pg)	60 dias	34,87±3,28aA	33,71±2,56aA	36,77±3,18aA	33,72±7,18aA	36,96±4,16aA
	Desafio	31,19±5,44aA	37,83±4,72aA	31,61±3,13aA	32,86±3,96aA	26,23±2,59aB
CHCM (%)	60 dias	25,72±2,06aA	24,68±3,93aA	28,07±2,53aA	24,81±3,90aA	25,16±3,77aA
	Desafio	21,85±3,85aA	30,48±5,59aA	22,32±2,71aA	26,19±2,30aA	25,34±3,09aA
Leucócitos totais ( $\mu$ L <sup>-1</sup> )	60 dias	26032,8±5158aA	36505,0±6213aA	20209,4±2783aB	34166,1±6951aA	30744,4±4446aB
	Desafio	37386,7±8843aA	40655,6±4109aA	59495,0±9962aA	45290,0±5954aA	49506,1±7211aA
Trombócitos totais ( $\mu$ L <sup>-1</sup> )	60 dias	52928±9326aA	68895±12025aA	58272±9253aA	75907±17900aA	62510±5234aA
	Desafio	46430±8411aA	40213±13129aA	54900±8158aA	49638±6038aA	58275±6539aA

Médias seguidas por mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não apresentam diferença significativa em relação aos níveis de  $\beta$ -glucano e tempo de amostragem (60 dias e desafio bacteriano), a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Abreviaturas: Ht – hematócrito, Hb – hemoglobina, RBC – número de eritrócitos, VCM – volume corpuscular médio, HCM – hemoglobina corpuscular média e CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média.

**Tabela 5.** Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaquis após suplementação de nucleotídeos dieta por 60 dias e 15 dias após desafio bacteriano.

Parâmetros	Tempos de amostragem	Nucleotídeos (% kg <sup>-1</sup> dieta)		
		0,0	0,2	0,5
Ht (%)	60 dias	23,70±1,39aB	23,36±1,56aB	23,63±0,92aB
	Desafio	28,33±1,09aA	28,73±1,05aA	26,83±1,19aA
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	60 dias	10,38±0,91aA	9,93±0,58aA	9,90±0,83aA
	Desafio	8,81±0,40aA	9,37±0,77aA	9,05±0,26aA
RBC (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	60 dias	2,21±0,17aA	2,24±0,21aA	2,01±0,12aA
	Desafio	1,92±0,12aA	2,15±0,22aA	1,93±0,19aA
VCM (µm <sup>3</sup> )	60 dias	125,69±14,27aA	113,29±10,20aA	122,67±8,19aB
	Desafio	156,34±15,35aA	146,42±14,25aA	162,76±16,84aA
HCM (pg)	60 dias	48,96±5,59aA	47,98±5,21aA	52,34±4,47aA
	Desafio	48,15±4,61aA	47,82±6,77aA	54,01±8,16aA
CHCM (%)	60 dias	41,69±4,60aA	38,66±4,31aA	42,35±2,67aA
	Desafio	31,27±1,16aB	33,17±3,28aA	34,72±2,30aB
GL (mg dL <sup>-1</sup> )	60 dias	56,42±3,83aA	55,58±2,61aA	61,58±1,84aA
	Desafio	40,83±1,62aB	42,73±1,83aB	41,58±1,66aB
PT (g dL <sup>-1</sup> )	60 dias	3,34±0,12aA	3,32±0,14aA	3,21±0,08aA
	Desafio	3,22±0,05aA	3,87±0,43aA	3,05±0,14aA

Médias seguidas por mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não apresentam diferença significativa em relação aos níveis de nucleotídeos e tempo de amostragem (60 dias e desafio bacteriano), a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Abreviaturas: Ht – hematócrito, Hb – hemoglobina, RBC – número de eritrócitos, VCM – volume corpuscular médio, HCM – hemoglobina corpuscular média, CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média, GL – glicose e PT – proteínas totais.

Para a contagem diferencial de leucócitos não foi observada diferença significativa em relação aos níveis de suplementação de β-glucano na dieta do tambaqui por 60 dias e após o desafio com *Aeromonas hydrophila* (Tabela 6). Entretanto, comparando-se os resultados obtidos após o desafio bacteriano com os de 60 dias observou-se redução significativa para os monócitos e neutrófilos na concentração de 0,4% de β-glucano e para os leucócitos imaturos nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8% de β-glucano (Tabela 6). Para os linfócitos, de forma inversa, observou-se aumento significativo nas concentrações de 0,4 e 0,8% de β-glucano (Tabela 6). Nessa avaliação, embora sem diferença significativa, observou-se ainda aumento do número de neutrófilos nos grupos suplementados com 0,1 e 0,2% de β-glucano e de monócitos na concentração de 0,2% de β-glucano, havendo também redução do número de linfócitos nos grupos suplementados com 0,1 e 0,2% de β-glucano (Tabela 6).

**Tabela 6.** Contagem diferencial de leucócitos de tambaquis após suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias e 15 dias após desafio bacteriano.

Leucócitos (%)	$\beta$ -Glucano (% kg <sup>-1</sup> dieta)				
	0,0	0,1	0,2	0,4	0,8
Monócitos					
60 dias	10,44±1,82aA	10,38±0,92aA	11,88±2,27aA	7,67±0,99aA	6,88±0,88aA
Desafio	7,44±1,59aA	5,67±1,97Aa	14,67±6,04aA	4,22±0,91aB	4,44±1,36aA
Linfócitos					
60 dias	68,22±4,26aA	79,63±1,93aA	68,88±6,33aA	75,22±2,91aB	78,25±2,22aB
Desafio	77,11±5,16Aa	73,67±7,13aA	65,44±10,09aA	88,22±2,91aA	86,11±2,64aA
CGE*					
60 dias	1,78±0,74aA	0,75±0,41aA	1,13±0,35aA	1,11±0,68aA	0,38±0,18aA
Desafio	0,44±0,24aA	1,56±0,75aA	1,22±0,68aA	0,56±0,39aA	0,78±0,36aA
Eosinófilos					
60 dias	0,67±0,37aA	0,63±0,50aA	1,38±0,84aA	1,00±0,44aA	0,63±0,26aA
Desafio	0,11±0,11aA	0,78±0,32aA	0,67±0,44aA	0,56±0,24aA	0,89±0,26aA
Neutrófilos					
60 dias	17,67±4,22aA	7,63±1,03aA	15,38±4,89aA	12,89±2,22aA	11,38±1,55aA
Desafio	14,44±4,02aA	10,14±3,26aA	17,78±4,91aA	5,89±2,21aB	7,78±1,72aA
Leuc					
Imat**					
60 dias	1,22±0,36aA	1,00±0,38aA	1,38±0,38aA	2,11±0,61aA	2,56±0,63aA
Desafio	0,44±0,18aA	0,11±0,11aA	0,22±0,15aB	0,56±0,18aB	0,0±0,0aB

Médias seguidas por mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não apresentam diferença significativa em relação aos níveis de  $\beta$ -glucano e tempo de amostragem (60 dias e desafio bacteriano), a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\* CGE – Célula Granulocítica Especial

\*\* Leuc Imat – Leucócitos Imaturos

Com relação aos parâmetros bioquímicos, não foram observadas diferenças significativas em 60 dias e após o desafio bacteriano para a glicose plasmática e proteínas totais no experimento I com  $\beta$ -glucano e no experimento II com nucleotídeos (Tabelas 5 e 7), assim como para albumina e globulina no experimento com  $\beta$ -glucano (Tabela 7). Para a relação albumina:globulina observou-se após o desafio bacteriano redução nesses valores no grupo que recebeu 0,2% de  $\beta$ -glucano, cujos valores foram significativamente diferentes das do grupo 0,4% de  $\beta$ -glucano (Tabela 7). Entretanto, comparando os resultados obtidos após o desafio bacteriano com os de 60 dias, observou-se no experimento I com  $\beta$ -glucano aumento significativo nos valores de glicose (0,4%), albumina (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) e na relação albumina:globulina (0,4 e 0,8%) (Tabela 7) e no experimento II com nucleotídeos houve aumento significativo da glicose sanguínea (Tabela 5).

**Tabela 7.** Parâmetros bioquímicos de tambaquis após suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias e 15 dias após o desafio bacteriano.

Parâmetros	Tempos de amostragem	$\beta$ -Glucano (% kg <sup>-1</sup> dieta)				
		0,0	0,1	0,2	0,4	0,8
GL (mg dL <sup>-1</sup> )	60 dias	72,94 ± 1,74aA	66,57±3,30aA	69,49±1,60aA	69,05±2,52aB	75,76±4,25aA
	Desafio	83,06±6,93aA	75,14±3,55aA	84,01±6,88aA	82,05±3,21aA	72,44±4,45aA
PT (g dL <sup>-1</sup> )	60 dias	3,25±0,23aA	3,36±0,17aA	3,79±0,52aA	3,60±0,28aA	3,89±0,32aA
	Desafio	3,79±0,24aA	4,75±0,86aA	3,73±0,16aA	3,53±0,19aA	3,07±0,41aA
AL (g dL <sup>-1</sup> )	60 dias	0,91±0,08aB	0,89±0,07aB	0,88±0,04aB	0,87±0,05aB	0,80±0,02aB
	Desafio	1,22±0,11aA	1,19±0,09aA	1,13±0,05aA	1,34±0,10aA	1,10±0,08Aa
GB (g dL <sup>-1</sup> )	60 dias	2,46±0,27aA	2,47±0,14aA	2,90±0,54aA	2,73±0,25aA	3,09±0,33aA
	Desafio	2,57±0,28aA	2,71±0,35aA	2,60±0,13aA	2,18±0,12aA	2,48±0,24aA
AL: GB	60 dias	0,37±0,05aA	0,37±0,04aA	0,37±0,05aA	0,33±0,03aB	0,30±0,03aB
	Desafio	0,53±0,09abA	0,50±0,07abA	0,44±0,02bA	0,62±0,03aA	0,49±0,04abA

Médias seguidas por mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não apresentam diferença significativa em relação aos níveis de  $\beta$ -glucano e tempo de amostragem (60 dias e desafio bacteriano), a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Abreviaturas: GL – glicose, PT – proteínas totais, AL – albumina, GB – globulina e AL:GB – albumina:globulina.

A concentração e atividade de lisozima sérica de tambaquis alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias apresentaram aumento significativo nos peixes que receberam 0,2% de  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  dieta em comparação aos demais tratamentos; com exceção do tratamento de 0,1% de  $\beta$ -glucano (Tabela 8). Após a realização do desafio bacteriano observou-se que a alimentação com  $\beta$ -glucano não exerceu efeito significativo sobre a concentração e atividade de lisozima (Tabela 8).

Em relação aos tempos de amostragem (antes e após o desafio bacteriano) também não foi observada diferença significativa para a concentração e atividade de lisozima (Tabela 8).

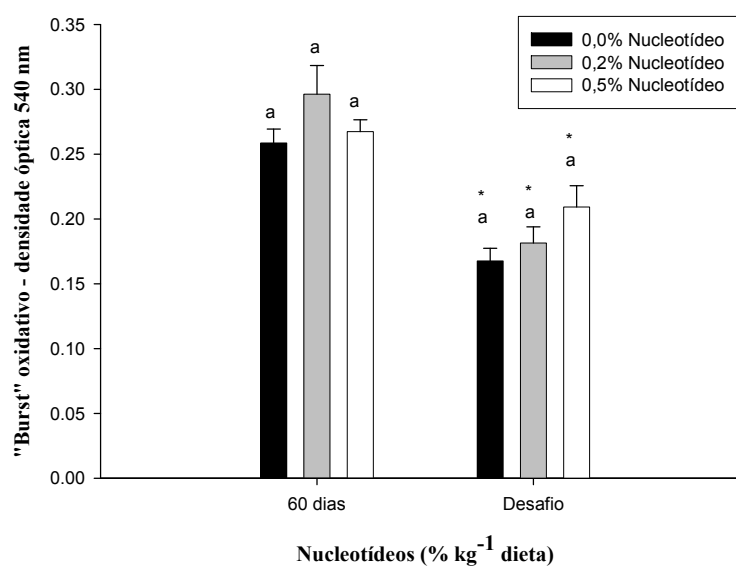
**Tabela 8.** Concentração ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) e atividade de lisozima ( $\text{U ml}^{-1}$ ) de juvenis de tambaquis alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano na dieta antes e após o desafio bacteriano.

$\beta$ -glucano (%)	Concentração de lisozima ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		Atividade de lisozima ( $\text{U ml}^{-1}$ )	
	Antes	Depois	Antes	Depois
0,0	0,18 $\pm$ 0,01 bA	0,24 $\pm$ 0,04 aA	30,64 $\pm$ 1,56 bA	39,70 $\pm$ 5,64 aA
0,1	0,23 $\pm$ 0,03 abA	0,23 $\pm$ 0,02 aA	39,14 $\pm$ 5,20 abA	38,24 $\pm$ 3,41 aA
0,2	0,36 $\pm$ 0,06 aA	0,22 $\pm$ 0,01 aA	58,98 $\pm$ 9,77 aA	36,57 $\pm$ 2,02 aA
0,4	0,20 $\pm$ 0,02 bA	0,26 $\pm$ 0,03 aA	34,59 $\pm$ 2,49 bA	43,67 $\pm$ 4,74 aA
0,8	0,19 $\pm$ 0,02 bA	0,22 $\pm$ 0,002 aA	32,70 $\pm$ 3,34 bA	37,54 $\pm$ 0,001 aA

Médias seguidas por mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não apresentam diferença significativa em relação aos níveis de  $\beta$ -glucano e tempo de amostragem (antes e após desafio bacteriano), a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os valores da densidade óptica da atividade respiratória de leucócitos não apresentaram diferença significativa entre os níveis de suplementação de nucleotídeos em 60 dias e após o desafio bacteriano (Figura 1). Entretanto, após o desafio observou-se redução significativa nos valores da densidade óptica em comparação àqueles observados em 60 dias de suplementação (Figura 1).





**Figura 1.** Atividade respiratória de leucócitos de tambaquís após suplementação de nucleotídeos por 60 dias e 15 dias após desafio bacteriano. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tempos de amostragem (60 dias e desafio bacteriano).

### Discussão

Na literatura há vários estudos descrevendo o efeito benéfico do  $\beta$ -glucano sobre o desempenho produtivo dos peixes, principalmente quanto ao aumento da taxa de crescimento de diferentes espécies de peixes (Cook et al., 2003; Misra et al., 2006; Ai et al., 2007; Sealey et al., 2008; Dalmo & Bogwald, 2008). Observações semelhantes foram relatadas quando da incorporação de misturas comerciais contendo nucleotídeos nas dietas de peixes, as quais resultam em melhor ganho de peso, contudo é provável que esta resposta varie em função da espécie, método de administração, quantidade de suplemento incorporada na dieta, duração da administração e temperatura ambiental (Cook et al., 2003; Bagni et al., 2005; Choudhury et al., 2005; Li & Gatlin III, 2006; Sealey et al., 2008; Dalmo & Bogwald, 2008).

Com relação ao tempo de administração dos imunostimulantes para obtenção de boas respostas sobre o desempenho produtivo dos peixes, ainda existem lacunas sobre a eficácia de sua suplementação por períodos prolongados. Neste estudo, a suplementação da dieta do tambaqui com  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos por 60 dias não exerceu influência sobre os parâmetros de desempenho produtivo da espécie. Resultados semelhantes foram relatados para tilápia do Nilo, “sea bass” e bagre de canal alimentados com dietas suplementadas com

$\beta$ -glucano (Whittington et al., 2005; Bagni et al., 2005; Welker et al., 2007) e para o híbrido “striped bass” alimentados com dietas suplementadas com nucleotídeos (Li et al., 2004), visto que eles não observaram aumento significativo no crescimento dos peixes após o período de administração dos imunostimulantes.

De forma semelhante ao observado para o tambaqui, Falcon (2007) avaliou a suplementação da dieta da tilápia do Nilo com níveis de  $\beta$ -glucano (0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%  $\text{kg}^{-1}$  dieta) e vitamina C (400 e 600  $\text{mg kg}^{-1}$  dieta) durante 60 dias, sendo observado que a suplementação não teve influência no desempenho produtivo da espécie. Em espécies como o híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis* a suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta por seis semanas não promoveu efeito significativo sobre o desempenho produtivo da espécie, ocasionando redução do ganho de peso e conversão alimentar, além de não produzir melhoras na resistência às doenças e na atividade da lisozima (Jaramillo Jr & Gatlin III, 2004).

Com relação à suplementação de nucleotídeos, embora esta promova, em alguns estudos, melhor crescimento em larvas de tilápia, juvenis de truta arco-íris e de *Sciaenops ocellatus* (Ramadan & Atef, 1991; Adamek et al., 1996; Gatlin III & Li, 2007). Por outro lado, para a maioria dos juvenis a influência da suplementação de nucleotídeos dietéticos no crescimento destes organismos tem se mostrado até certo ponto marginal (Li et al., 2004; Gatlin III & Li, 2007), o que é corroborado pelo presente estudo com tambaquis visto tratar-se também de juvenis.

Neste estudo, o emprego dos imunostimulantes  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta dos tambaquis não promoveu efeito benéfico quanto aos parâmetros de desempenho produtivo. Entretanto, observou-se melhor ganho de peso e conversão alimentar nos peixes que receberam dietas suplementadas com nucleotídeos, independente do nível de suplementação, e isto se deve, em parte, aos níveis mais altos de proteínas apesar de tratar-se da mesma composição de ingredientes e também a menor densidade populacional utilizada nesse experimento. Com relação à conversão alimentar obtida nos dois experimentos, os valores estão próximos aos relatados para a criação de tambaqui na região Sudeste (1,92) e acima da observada na região Norte (1,2-1,5) (Souza et al., 1998; Melo et al., 2001; Izel & Melo, 2004). Entretanto, apesar dessas diferenças, os valores de conversão alimentar observados neste estudo para o tambaqui são satisfatórios, principalmente na escala experimental utilizada neste estudo.

O bom desempenho produtivo obtido nos dois experimentos (experimento I –  $\beta$ -glucano e experimento II - nucleotídeos), independente do nível de suplementação dos

imunoestimulantes, foi refletido na manutenção do equilíbrio orgânico dos tambaquis, como determinado pela avaliação dos parâmetros hematológicos em 60 dias de criação.

Neste estudo, a suplementação de  $\beta$ -glucano (experimento I) e nucleotídeos (experimento II) na dieta do tambaqui não promoveu alterações no hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média após 60 dias de criação, estando estes valores dentro da faixa considerada satisfatória para peixes hígidos (Marcon et al., 1999; Tavares-Dias et al., 2009). Entretanto, com relação às alterações sanguíneas causadas pelo desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila* pode-se caracterizar a ocorrência de anemia nos tambaquis pela redução do percentual de hematócrito e do número de eritrócitos. No experimento I com  $\beta$ -glucano a anemia foi classificada em normocítica-normocrômica e no experimento II com nucleotídeos a ocorrência de anemia foi do tipo macrocítica-hipocrômica. De forma semelhante ao observado para o tambaqui, houve redução nos valores de hematócrito após desafio bacteriano em pacus e tilápias do Nilo alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano (Falcon, 2007; Biller, 2008). Esse quadro se deve a ocorrência de hemorragias provocadas por essa bactéria (Campbell & Ellis, 2007), visto que as *Aeromonas* spp. produzem hemolisina e esta é a causa mais comum de anemia hemolítica em peixes (Groff & Zinkl, 1999).

Alterações sanguíneas como o quadro de anemia observado em tambaquis também foram relatados em outros estudos por Garcia & Moraes (2009) ao desafiarem o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com a bactéria *A. hydrophila*, observando após 24 horas a ocorrência de anemia normocítica-hipocrômica, além de redução dos níveis de proteínas totais, número de trombócitos, leucócitos totais, linfócitos e eosinófilos, com aumento do número de neutrófilos e monócitos (Garcia & Moraes, 2009). De forma semelhante, em *Cyprinus carpio* infectadas com *A. hydrophila* foi descrita diminuição do hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos, acompanhada de leucocitose (Harikrishnan et al., 2003). Com relação ao perfil de anemia normocítica-normocrômica observada nos tambaquis do experimento com  $\beta$ -glucano, esse mesmo padrão foi observado em tambaquis alimentados com dietas isentas da suplementação de ácido ascórbico (Chagas & Val, 2003).

Neste estudo, além do perfil de anemia observado pode-se visualizar no experimento II com nucleotídeos aumento significativo do hematócrito (0; 0,2 e 0,5%) e do volume corpuscular médio (0,5%) após o desafio bacteriano. Segundo Morgan & Iwama (1997) as mudanças no hematócrito durante o estresse podem indicar a ocorrência de hemoconcentração ou hemodiluição devido aos distúrbios osmorregulatórios. Nos tambaquis, o estresse

ocasionado pelo desafio com *A. hydrophila* foi capaz de influenciar a sua homeostase orgânica, promovendo alterações eletrolíticas com consequente influxo de água na célula, levando ao aumento do volume das células (McDonald & Milligan, 1997).

Em tambaquis alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano e desafiados com *A. hydrophila* houve aumento significativo nos leucócitos totais (0,2 e 0,8% de  $\beta$ -glucano) e linfócitos (0,4 e 0,8% de  $\beta$ -glucano) em comparação com aqueles registrados antes do desafio bacteriano. Esses resultados são contrários aos esperados, pois em situação de estresse os peixes apresentam diminuição dos leucócitos totais e linfócitos circulantes em função da liberação de catecolaminas e cortisol que ocasionam a constrição esplênica, aumento do fluxo sanguíneo e migração de alguns leucócitos, com prejuízo nas funções fagocitárias das células (Barton & Iwama, 1991; McDonald & Milligan, 1992; Wendelaar Bonga, 1997). Por outro lado, nos tratamentos 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano observou-se o padrão esperado com redução numérica no número de linfócitos circulantes, o que segundo Pickering (1986) pode estar associada à capacidade do peixe de se defender contra agentes patogênicos.

Linfopenia e neutrofilia são comumente observadas em peixes expostos a agentes estressores (Espelid et al., 1996; Ellsaesser & Clem, 1986). Neste estudo, os neutrófilos apresentaram-se diminuídos após o desafio bacteriano no tratamento com 0,4% de  $\beta$ -glucano; sendo observada também a ocorrência de monocitose. Em tilápias do Nilo, Falcon (2007) observou neutrofilia nos peixes alimentados com as dietas suplementadas com 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano e monocitose em todos os tratamentos com  $\beta$ -glucano.

Neste estudo, os menores níveis de suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta do tambaqui e o consequente desafio com *A. hydrophila* foram responsáveis pela maior presença no sangue de células fagocíticas como neutrófilos (0,1 e 0,2%) e monócitos (0,2%), sugerindo que essas concentrações de  $\beta$ -glucano promoveram boa resposta de leucócitos contra o agente patogênico, como observado também pelos menores percentuais de mortalidade após desafio.

Com relação aos parâmetros bioquímicos, observou-se que em 60 dias de criação os valores de glicose e proteínas totais (experimentos I e II), bem como da albumina, globulina e relação albumina:globulina (experimento I) apresentaram-se dentro da faixa considerada fisiológica para peixes hígidos (Chagas et al., 2003). Após o desafio bacteriano, houve redução significativa nos valores de glicose sanguínea dos tambaquis, independente do nível de suplementação de nucleotídeos (experimento II), em relação a 60 dias, o que reflete o efeito metabólico do jejum que os animais foram submetidos durante o desafio bacteriano. Entretanto, a redução na relação albumina:globulina no grupo suplementado com 0,2% de  $\beta$ -

glucano em relação ao de 0,4% de  $\beta$ -glucano é decorrente do aumento da porcentagem de globulinas, embora não significativo, neste tratamento. De forma semelhante, Misra et al. (2006) relataram um aumento da porcentagem de globulina em carpas indianas (*Labeo rohita*) alimentadas com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano. Sahoo & Mukherjee (2001) relataram o aumento de globulinas no soro como mecanismo de defesa para os peixes, havendo conseqüentemente redução na relação A:G em peixes alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano.

Os efeitos negativos de altas doses e prolongada alimentação com  $\beta$ -glucano sobre a resposta imune dos peixes e resistência a doenças foi relatada por Anderson (1992) e Couso et al. (2003), sendo observado aumento da susceptibilidade de salmão do Atlântico (Robertsen et al., 1990), truta arco-íris (Jeney et al., 1998) e gilthead seabream (Couso et al., 2003) a infecções bacterianas quando do fornecimento da dieta naquelas condições. Neste estudo, as maiores concentrações de  $\beta$ -glucano (0,4 e 0,8%) fornecidas na dieta do tambaqui por período prolongado (60 dias) também promoveram maior taxa de mortalidade após o desafio com *Aeromonas hydrophila* (38,10% em ambos os tratamentos), o que condiz com os estudos de Whittington et al. (2005) que mostraram que altas dosagens de  $\beta$ -glucano podem determinar a exaustão das células fagocíticas, sugerindo a possível diminuição da atividade.

No experimento I com  $\beta$ -glucano, o fornecimento de dieta suplementada com 0,1 % de  $\beta$ -glucano para os tambaquis resultou em menor taxa de mortalidade após o desafio bacteriano. Resultados similares foram observados com espécies nativas como o pacu, onde o mesmo nível de suplementação de 0,1% de  $\beta$ -glucano, porém, por sete dias promoveu maior sobrevivência dos peixes quando desafiados com *A. hydrophila* (Biller, 2008). Resultados semelhantes relatando o aumento da resistência dos peixes alimentados com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano quando desafiados com *A. hydrophila* foram relatados para *Cyprinus carpio* e *Clarias batrachus* (Selvaraj et al., 2005; Kumari & Sahoo, 2006).

No experimento II com nucleotídeos, observou-se que os tambaquis alimentados com dieta suplementada com 0,2% de nucleotídeo não apresentaram mortalidade após o desafio com *A. hydrophila*. Em outro estudo, Sakai et al. (2001) administraram em carpa comum (*Cyprinus carpio*) a suplementação de nucleotídeos por via oral (15 mg peixe<sup>-1</sup>) durante três dias. Após essa suplementação, realizou-se o desafio com *Aeromonas hydrophila* ( $3 \times 10^7$  células ml<sup>-1</sup>) por injeção intraperitoneal e determinou-se o número de bactérias no sangue, fígado e rim em 2, 4, 8 e 12 h após injeção. Em todos os tecidos dos peixes suplementados com nucleotídeos nenhuma cepa de *A. hydrophila* foi detectada até 12 h após o desafio quando comparado ao grupo controle, mostrando que a suplementação com nucleotídeo foi

responsável pela redução da infecção por *A. hydrophila* em carpa comum, da mesma forma como observado neste estudo em tambaquis alimentados com dieta suplementada com 0,2% de nucleotídeos, baseado nos dados de sobrevivência da espécie após desafio, que determina resistência à doença.

Este estudo demonstrou que o fornecimento de dietas suplementadas com 0,2% de nucleotídeos para o tambaqui exerceu influência positiva sobre a sua resistência contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, mostrando ser mais efetiva que a suplementação de  $\beta$ -glucano, com resultados similares sendo relatados em salmonídeos por Burrels et al. (2001). Em parte, a menor ocorrência de infecção por *A. hydrophila* nos peixes alimentados com dieta suplementada com 0,2% nucleotídeos pode ser devida à redução de efeitos nocivos do estresse e da concentração plasmática de cortisol, conforme relatado por Burrels et al. (2001), Belo et al. (2005) e Moraes & Moraes (2009).

A bactéria *Aeromonas hydrophila* é o agente etiológico da septicemia hemorrágica. Nos tambaquis inoculados com essa bactéria tanto no experimento I com  $\beta$ -glucano quanto no experimento II com nucleotídeos, com exceção do grupo suplementado com 0,2% de nucleotídeos, observou-se após as 24 horas iniciais da inoculação, petéquias localizadas em toda a superfície corporal, lesões ulcerativas, exoftalmia e distensão abdominal por ascite (Merino et al., 1995; Austin & Austin, 1999; Kirov et al., 2002).

Alguns estudos conduzidos com  $\beta$ -glucano em peixes sugerem que a administração de dietas suplementadas com este imunostimulante promove aumento da resistência de várias espécies de peixes contra infecções bacterianas e protozoárias (Raa et al., 1990; Nikl et al., 1993; Siwicki et al., 1994; Yoshida et al., 1995; Efthimiou, 1996; Robertsen, 1999). O modo pelo qual o  $\beta$ -glucano aumenta a resistência a doenças se dá pelo aumento dos mecanismos não-específicos de defesa, mais do que pelo aumento das respostas imunes específicas (Whittington et al., 2005). Resultados de estudos anteriores mostram o aumentado efeito do  $\beta$ -glucano sobre a resposta imune não-específica, como observado por Paulsen et al. (2003) que demonstraram que o  $\beta$ -glucano é capaz de estimular as defesas não-específicas dos peixes contra infecção por aumentar a expressão da lisozima.

Neste estudo, a suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta dos tambaquis por 60 dias promoveu um pronunciado aumento na concentração e atividade de lisozima dos peixes que receberam a suplementação de 0,2% de  $\beta$ -glucano. Entretanto, todos os outros grupos apresentaram os valores de concentração e atividade de lisozima dentro do mesmo intervalo de variação (0,18 - 0,23  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 30,64 - 39,14 U  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente). Após a realização do desafio bacteriano observou-se que a concentração e atividade de lisozima não foram

afetadas pelos níveis de suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta do tambaqui. Os valores da concentração e atividade de lisozima em tambaquis são próximos aos observados em espécies nativas como o pacu (Abreu, 2007; Biller, 2008). Em outros estudos com  $\beta$ -glucano observou-se que os níveis de lisozima em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*) não se apresentaram aumentados após a suplementação alimentar (Verlhac et al., 1998; Whittington et al., 2005; Selvaraj et al., 2006; Welker et al., 2007; Sealey et al., 2008). Entretanto, se esse efeito adverso foi um resultado dos níveis de suplementação de  $\beta$ -glucano e/ou do emprego prolongado dessa suplementação na dieta do tambaqui não pode ser verificado neste estudo.

A fagocitose é um mecanismo eficaz para a destruição de patógenos e proteção contra doenças em peixes (Sharp & Secombes, 1993; Sakai et al., 2001; Selvaraj et al., 2006; Ai et al., 2007; Lin et al., 2009; Siwicki et al., 2009). Neste estudo, o efeito da suplementação de nucleotídeos na dieta do tambaqui sobre a atividade respiratória de leucócitos não pode ser observada após 60 dias, sendo esse mesmo padrão de resposta observado em salmonídeos (Burrels et al., 2001). Entretanto, houve redução na atividade respiratória de leucócitos, independente do nível de suplementação de nucleotídeos na dieta do tambaqui, após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Nos peixes desafiados, o tratamento sem nucleotídeo foi o que apresentou numericamente menor atividade respiratória de leucócitos, sugerindo menor proteção após desafio por *A. hydrophila*. Esses resultados são contrários aos relatados por Lin et al. (2009) em garoupas que observaram maior produção de anion superóxido ( $O_2^-$ ) de leucócitos oriundos de peixes alimentados com dietas suplementadas com 1,5 g da mistura de nucleotídeos  $kg^{-1}$  de ração (Lin et al., 2009). Em parte, esse efeito adverso observado com a redução da atividade respiratória de leucócitos do tambaqui após o desafio bacteriano se deva ao tempo de avaliação deste indicador que não possibilitou visualizar o pico máximo de sua atividade.

Os resultados permitem concluir que a suplementação de  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na dieta do tambaqui não influenciaram o desempenho produtivo; que o desafio bacteriano promoveu anemia normocítica-normocrômica ( $\beta$ -glucano) e anemia macrocítica-hipocrômica (nucleotídeos); que a suplementação de  $\beta$ -glucano não alterou a concentração e atividade de lisozima e a de nucleotídeos determinou redução na atividade respiratória de leucócitos, e que a menor suplementação dos imunostimulantes (0,1% de  $\beta$ -glucano e 0,2% de nucleotídeos) promoveu maior sobrevivência para a espécie após o desafio com *Aeromonas hydrophila*.

## Referências

- ABREU, J. S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com  $\beta$  1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura.** Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.
- ACERETE, L.; BALASCH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v.237, p.167-178, 2004.
- ADAMEK, Z.; HAMACKOVA, J.; KOURIL, J.; VACHTA, R.; STIBRANYIOVA, I. Effect of ascogen probiotics supplementation on farming success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and wells (*Silurids glais*) under conditions of intensive culture. **Krmiva (Zagreb)**, v. 38, p. 11-20, 1996.
- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394-402, 2007.
- AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 32, p. 162-173, 2001.
- ANDERSON, D. A. In vitro immunization of fish spleen sections and NBT, phagocytic, PFC and antibody assays for monitoring the immune response. In: STOLEN, J. S.; FLETCHER, T. C.; ANDERSON, D. P.; KAATARI, S. L.; ROWLEY, A. F. (Eds.). **Techniques in Fish Immunology**. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1992. p. 79– 88.
- 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.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 175-202.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 1998. 186 p.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Chichester: Springer Praxis, 3<sup>rd</sup> Edition. 1999. 459p.



- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOLA, M. G.; ABELLI, L.; SACAPIGLIATI, G.; TISCAR, P. G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, p. 311-25, 2005.
- BARTON, B.A.; BOLLING, H.; HAUSKINS, B.; JANSEN, C.R. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns* x *S. platyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 126A, p. 125-134, 2000.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, p. 12-18, 2000.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of cortivosteroids. **Annual Review of Fish Disease**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M.; MORAES, J. E. R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 146-154, 2005.
- BILLER, J. D. **Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano**. 2008. 114 f. Dissertação – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- BOYD, C. E.; QUEIROZ, J. F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Ed. TecArt, 2004. p. 25-44.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 349-356, 2006.
- BUCHMANN, K.; ROEPSTORFF, A.; WALLER, P.J. Experimental selection of mebendazole-resistant gill monogeneans from the european eel, *Anguilla-Anguilla* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 15, p. 393-400, 1992.
- BURRELS, C.; WILLIAM, P. D.; FORNO, P. F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. **Aquaculture**, v. 199, p. 159-169, 2001.

- CAMPBELL, T.; ELLIS, C. **Avian and exotic animal hematology and cytology**. New York: Wiley-Blackwell, 2007.
- CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 397-402, 2003.
- CHAGAS, E. C.; LOURENÇO, J. N. P.; GOMES, L. C.; VAL, A. L. Desempenho e estado de saúde de tambaquis cultivados em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. In: URBINATI, E. C.; POSSEBON-CYRINO, J. E. (Ed.). **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**. Jaboticabal, 2003, p. 83-93.
- CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T.E.H.P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 132-225.
- CHOUDHURY, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, S.; DAS, S. S.; MUKHERJEE, S. C. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 281-91, 2005.
- COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B. F.; HAYBALL, J. D. Administration of a commercial immunostimulant preparation. Ecoactiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v.14, p.333-345, 2003.
- COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARINOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effects of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. **Aquaculture**, v. 219, p. 99– 109, 2003.
- DALMO, R. A.; BOGWALD, J.  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p. 384-396, 2008.
- DILUZIO, N.R. Update on the immunomodulating activities of glucans. **Springer Seminar Immunopathology**, v. 88, p. 387-400, 1985.
- EFTHIMIOU, S. Dietary intake of h-1,3/1,6 glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae: effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 12, p. 1– 7, 1996.
- ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B. (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications, 1990. p. 101-103.

ELLSAESSER, C. F.; CLEM, L. W. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 511-521, 1986.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, E.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, p. 287-297, 1992.

ERDAL, J.I., EVENSEN, O., KAURSTAD, O.K., ILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. **Aquaculture**, v. 98, p. 363-379, 1991.

ESPELID, S.; LOKKEN, G. B.; STEIRO, K.; BOGWALD, J. Effects of cortisol and stress on immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 6, p. 95-110, 1996.

FALCON, D. R. **Nível de suplementação de 1,3 β-glucano e vitamina C em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos**. 2007. 146 f. Tese – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

GARCIA, F.; MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, v. 31, p. 17-21, 2009.

GATLIN III, D. M.; LI, P. Nucleotides. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. (Ed.). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. UK: Cromwell Press, p. 193-209, 2007.

GRANT, A.; BRIGGS, A. D. Use of ivermectin in marine fish farms: some concerns. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, p. 566-568, 1998.

GROFF, J. M.; ZINKL, J. G. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 2, p. 741-776, 1999.

HARIKRISHNAN, R.; NISHA RANI, M.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v.221, p.41-50, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Produção brasileira da Aqüicultura Continental, por Estado e espécie, para o ano de 2005**: Estatística da Aqüicultura e Pesca no Brasil – Ano 2005. Brasília: SEAP, 2005. 101 p.

- IZEL A. C. U.; MELO, L. A. S. **Criar matrinxã: atividade econômica potencial para o agronegócio amazonense**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2004. 22 p.
- JARAMILLO, F. Jr.; GATLIN, D. M. III. Comparison of purified and practical diets supplemented with or without  $\beta$ -glucan and selenium on resistance of hybrid striped bass to *Streptococcus iniae* infection. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 35, p. 245-252, 2004.
- JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, A.; ANDERSON, D. P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v. 154, p. 1–15, 1998.
- JORGENSEN, J. B.; ROBERTSEN, B. Yeast beta-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo Salar* L) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 43–57, 1995.
- JORGENSEN, J.B.; SHARP, J.E.; SECOMBES, C.J.; ROBERSEN, B. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, p. 267-277, 1993.
- KIROV, S.M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.T.; ODO NOVAN, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 547-555, 2002.
- KLEIN, J. **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc., 1990. p. 311-334.
- KUMARI, J.; SAHOO, P. K. Dietary  $\beta$ -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 95-101, 2006.
- LEONARDI, M.; SANDINO, A. M.; KLEMPAU, A. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 23, p. 52-59, 2003.
- LI, P.; GATLIN III, D. M. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v. 251, p. 141-152, 2006.
- LI, P.; LEWIS, D. H.; GATLIN III, D. M. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 561-569, 2004.

- LIN, Y. H.; WANG, H.; SHIAU, S. Y. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v. 15, p. 117-122, 2009.
- LOW, C.; WADSWORTH, S.; BURRELS, C.; SECOMBES, C. J. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. **Aquaculture**, v. 221, p. 23-40, 2003.
- MALTA, J.C.O.; GOMES, A.L.S.; ANDRADE, S.M.S.; VARELLA, A.M.B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* GOLVAN, 1956, (EOACANTHOCEPHALA, NEOECHINORHYNCHIDAE) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001.
- MARCON, J. L.; CHAGAS, E. C.; KAVASSAKI, J. M.; VAL, A. L. Intraerythrocytic phosphates in 25 fish species of the Amazon: GTP as a key factor in the regulation of Hb-O<sub>2</sub> affinity. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. (Ed.). **Biology of Tropical Fishes**. Manaus: INPA, 1999, p. 229-240.
- MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; POLIZELLO, A.C.; AZZOLINI, A.E.; LUCISANO-VALIM, Y.M. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunological Investigations**, v. 28, p. 89-101, 1999.
- McDONALD, D. G.; MILLIGAN, C. L. Chemical properties of the blood. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish Physiology**. London: Academic Press, 1992. v.12A, p.55-133.
- McDONALD, D. G.; MILLIGAN, C. L. Ionic, osmotic and acidbase regulation in stress. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p.119-144.
- MELO, L.A.S.; IZEL, A.C.U.; RODRIGUES, F.M. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas**. Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 25p.
- MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 157-168, 1995.
- MISRA, C.K.; DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, v. 255, p. 82-94, 2006.

- MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 625-723.
- MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G. W.; PICKERING, A. D.; SUMMER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 247-270, 1997.
- NIKL, L.; EVELYN, T.P.T.; ALBRIGHT, L.J. Trials with an orally and immersion-administered beta-1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 17, p. 191-196, 1993.
- PAULSEN, S. M., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast  $\beta$ -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 23-37, 2001.
- PAULSEN, S. M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. *In vivo* effects of  $\beta$ -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, p. 39-54, 2003.
- PICKERING, A.D. Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season. **Journal of Fish Biology**, v.29, p.335-347, 1986.
- PILARSKI, F.; SAKABE, R. Principais enfermidades diagnosticadas no Estado de São Paulo: Profilaxia ou Tratamento?. In: PEZATTO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M.; CYRINO, J. E. P.; FERNANDES JÚNIOR, A. C. (Ed.). **Anais do 3<sup>o</sup> Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes**. Botucatu, 2009, p. 101-130.
- PLUMB, J.A.; BOWSER, P.R. **Microbial fish disease laboratory manual**. Alabama: Auburn University, Alabama Agriculture Experiment Station, 1983. 95 p.
- RAA, J.; ROERSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, I. M.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R. (Eds.). **Diseases in Asian Aquaculture**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1990, p. 39– 50.
- RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, p. 229-288, 1996.
- RAMADAN, A.; ATEF, M. Effect of the biogenic performance enhancer (Ascogen “S”) on growth rate of tilapia fish. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 87, p. 304-306, 1991.
- ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish & shellfish immunology**, v. 9, p. 269– 290, 1999.

ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, p. 391-400, 1990.

SAHOO, P. K.; KUMARI, J.; MISHRA, B. K. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, p. 151-155, 2005.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary 1,3  $\beta$ -glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced immunocompromised rohu *Labeo rohita* Hamilton. **Fish & Shellfish Immunology**, v.11, p.683-95, 2001.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American fresh water fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.

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

SAKAI, M.; TANIGUCHI, K.; MAMOTO, K.; OGAWA, H.; TABATA, M. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, p. 433-438, 2001.

SEALEY, W. M.; BARROWS, F. T.; HANG, A.; JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K.; LAPATRA, S. E.; HARDY, R. W. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of  $\beta$ -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 115-28, 2008.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Adjuvant and immunostimulatory effects of  $\beta$ -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 15-24, 2006.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function and infection with *Aeromonas hydrophila*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 57, n. 1, p. 39-48, 2005.

SHARP, G. J. E.; SECOMBES, C. J. The role of oxygen reactive species in the killing of bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, p. 119-129, 1993.

SILVA, C.M.A. **Bactérias gram-negativas isoladas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas-Brasil**. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

- SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 41, p. 125– 139, 1994.
- SIWICKI, A. K.; ZAKES, Z.; TERECH-MAJEWSKA, E.; KOWALSKA, A.; MALACZEWSKA, J. Supplementing the feed of pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)] juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. *Aquaculture Research*, v. 40, p. 405-411, 2009.
- SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 15, p. 71-90, 2003.
- SORUM, H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: AARESTRUP, F.M. (Ed.). **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. Washigton DC: ASM Press, 2006. p. 213-238.
- SOUZA, R. A.; MELO, J. S. C.; PEREIRA, J. A.; PERET, A. C. Determinação da desnidade de estocagem de alevinos de tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier 1818 (Pisces; Characidae) no estado do Pará – Brasil. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 11, p. 39-48, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S. B.; JERÔNIMO, G. T.; SANT`ANA, A. R. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN-NETO, M.; POZZOBON-SORIA, W. S. (Eds.). **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009, p. 43-72.
- VAINIKKA, A.; JOKINEN, E.I.; KORTET, R.; PAUKKU, S.; PIRHONEN, J.; RANTALA, M.J.; TASKINEN, J. Effects of testosterone and  $\beta$ -glucan on immune functions in tench. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 348-361, 2005.
- VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, v. 33, p. 107-114, 1998.
- VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHUEP, W., HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 409-424, 1998.
- WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell or yeast subcomponents. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 24-35, 2007.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.



- WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIOUS, P. H. Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, p. 217-25, 2005.
- WON, K. M.; KIM, S. M.; PARK, S. I. The effects of b-1,3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthyes olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology**, v. 17, p. 29-38, 2004.
- YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. Augmentation of nonspecific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, p. 195–198, 1995.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663p.

## **CAPÍTULO III**

**Respostas de estresse de tambaquis (*Colossoma macropomum*)  
alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano e  
nucleotídeos após transporte em sistema fechado**

## RESUMO

O transporte de peixes é uma prática indispensável na piscicultura. Entretanto, este procedimento considerado traumático induz respostas de estresse em função da sucessão de estímulos adversos com consequências negativas para a saúde dos peixes. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas de estresse de tambaquis alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos após transporte em sistema fechado. Para isto, foram utilizados 360 peixes ( $31,76 \pm 3,30$  g;  $11,9 \pm 0,09$  cm) em dois diferentes experimentos. No experimento I avaliou-se o emprego de diferentes concentrações de  $\beta$ -glucano (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%  $\text{kg}^{-1}$  dieta) e no experimento II o emprego de nucleotídeos (0; 0,2 e 0,5%  $\text{kg}^{-1}$  dieta) como suplemento dietário. Após 60 dias de alimentação com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos, os peixes foram transportados em rodovia por três horas em sistema fechado. Foram avaliadas as respostas de estresse por meio de indicadores hematológicos, bioquímicos e imunológicos nos tempos antes do transporte (AT), imediatamente após o transporte (DT), 24 e 48 horas depois do transporte (24 e 48h DT). No experimento I com  $\beta$ -glucano, houve imediatamente após o transporte aumento significativo da concentração plasmática de cortisol e da glicemia em relação ao controle, sendo observado também elevação da concentração de hemoglobina nos peixes isentos da suplementação de  $\beta$ -glucano e da hemoglobina corpuscular média nas concentrações de 0; 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano. No experimento II com nucleotídeos, houve aumento significativo da glicemia, da atividade respiratória de leucócitos, do hematócrito e do volume corpuscular médio em todas as concentrações de nucleotídeos, além de redução do número de eritrócitos no grupo isento da suplementação de nucleotídeos imediatamente após o transporte. Os resultados deste estudo permitiram estabelecer que as alterações dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e da atividade respiratória de leucócitos ocorreram imediatamente após o transporte, com retorno aos níveis basais após 24 e 48 horas de recuperação. Contudo, a suplementação de  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos na dieta do tambaqui não foi eficiente em mitigar as respostas de estresse.

Palavras chave: Transporte, tambaqui, estresse, imunoestimulantes.

## ABSTRACT

Fish transportation is an unavoidable practice in fish culture. This procedure is traumatic and the stress elicited has negative effects on fish health. The aim of this study was to evaluate the physiological stress response of tambaqui fed  $\beta$ -glucan or nucleotide supplemented diet after being transported in a closed system. A total of 360 fish ( $31.76 \pm 3.30$  g;  $11.9 \pm 0.09$  cm) were used in two experiments. The experiment I evaluated the use of different  $\beta$ -glucan concentration (0; 0.1; 0.2; 0.4 and 0.8%  $\text{kg}^{-1}$  diet) and the experiment II the use of nucleotide (0; 0.2 and 0.5%  $\text{kg}^{-1}$  diet). After 60 days of experimental feeding, fish were transported on paved roads for three hours in a closed system. Stress responses were evaluated by hematological, biochemical and immune indicators before the transportation (AT), immediately after the transportation (DT) and 24, 48 hours after the transportation (24 and 48h DT). In the first experiment with  $\beta$ -glucan, the cortisol and glucose levels increased immediately after the transportation compared to the control, the haemoglobin increased in the fish fed without  $\beta$ -glucan and the mean corpuscular hemoglobin in concentrations of 0; 0.1 e 0.2%  $\beta$ -glucan. In the second experiment with nucleotide, there was a significant increase of glucose, respiratory burst, hematocrit and the mean corpuscular volume in all the nucleotide concentrations, in addition to reduce the erythrocytes number in the group without the nucleotide supplementation immediately after transportation. The results of this study demonstrated that the alteration in the hematological, biochemical and respiratory burst occurred immediately after the stress caused by the transportation and returned to base levels after 24 and 48 h. However the  $\beta$ -glucan and nucleotide supplementation did not reduce the stress responses.

Key words: Transportation, tambaqui, stress, immunostimulants.

## Introdução

O transporte de peixes envolve procedimentos de captura, confinamento, manuseio, adensamento e o transporte propriamente dito. É uma prática indispensável na piscicultura e indutora de respostas de estresse (Gomes et al., 2006; Brandão et al., 2006; 2008; Gomes et al., 2008) com consequências negativas para a saúde dos peixes (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2000; Barton et al., 2000).

As respostas aos estímulos estressores são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária (Barton & Iwama, 1991). Diante de um estressor, a resposta primária consiste na rápida liberação de catecolaminas e cortisol para a circulação sistêmica (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Barton & Iwama, 1991; Acerete et al., 2004). A resposta secundária está relacionada a ajustes bioquímicos e fisiológicos que incluem hiperglicemia, alterações no conteúdo de ácido láctico, glicogênio hepático e muscular, no número de células vermelhas e brancas, e no equilíbrio hidro-eletrolítico que inclui alterações nas concentrações plasmáticas de íons cloro, sódio, potássio, proteínas e na osmolaridade (Barton & Iwama, 1991; McDonald & Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). A resposta terciária inclui o comprometimento no desempenho, mudanças no comportamento e aumento da suscetibilidade às doenças (Wedemeyer, 1996; Wendelaar Bonga, 1997).

O conhecimento das respostas de estresse em operações de transporte de peixes é primordial para o estabelecimento de práticas de manejo adequadas (Wedemeyer, 1997), na tentativa de reduzir a mortalidade dos peixes pós-transporte (Takahashi et al., 2006; Sink & Neal, 2009). Assim, o uso de várias substâncias foi avaliado no sentido de minimizar o efeito de agentes estressores como cloreto de sódio (Gomes et al., 2003; Gomes et al., 2006; Brandão et al., 2008), sulfato de cálcio (Bendhack & Urbinati, 2009), anestésicos (Urbinati & Carneiro, 2001; Sink & Neal, 2009) e a suplementação da dieta com tipos variados de imunoestimulantes (Sakai, 1999; Li & Gatlin III, 2006; Dalmo & Bogwald, 2008).

Os imunoestimulantes são considerados substâncias biológicas que possuem a capacidade de influenciar e aumentar a efetividade dos mecanismos específicos e não específicos de defesa dos animais (Verlhac et al., 1998; Raa, 2000; Vainikka et al., 2005; Chagas et al., 2009). Dentre os compostos com características imunoestimulantes utilizados na aquicultura destacam-se os glucanos e nucleotídeos.

Os  $\beta$ -glucanos são macromoléculas formadas por blocos de glicose unidos por ligações  $\beta$  (1-3) e  $\beta$  (1-6), encontrados na parede celular de levedura e fungos, funcionando como imunoestimulante em peixes (Robertsen et al., 1990; Cook et al., 2003). Sua administração mostrou-se benéfica na prevenção dos efeitos negativos do estresse em peixes,

ressaltando a importância do seu emprego como medida profilática (Anderson, 1992; Selvaraj et al., 2005). Em *Oncorhynchus mykiss*, houve supressão das respostas primárias e secundárias do estresse de transporte, sugerindo que baixos níveis de  $\beta$ -glucano poderiam ser administrados na dieta antes do transporte para prevenir esses efeitos negativos (Jeney et al., 1997).

Os nucleotídeos estão presentes em todos os alimentos de origem animal e vegetal como nucleotídeos livres e ácidos nucléicos. Atualmente, vários suplementos de nucleotídeos estão disponíveis no mercado, sendo estes mononucleotídeos e/ou oligonucleotídeos derivados da levedura (Gatlin III & Li, 2007). Segundo Gatlin III & Li (2007) os nucleotídeos dietéticos, possivelmente, influenciam benéficamente o sistema imune dos peixes por inibir a liberação do cortisol em situações de estresse.

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é a espécie mais cultivada na região Norte do Brasil por apresentar bom desempenho em sistemas de criação intensiva (Melo et al., 2001; Arbeláez-rojas et al., 2002; Gomes et al., 2006), alcançando 3,0 kg de peso em 12 meses de criação em sistemas de viveiros/barragens (Melo et al., 2001). Entretanto, existem poucos estudos avaliando a eficácia do emprego de imunoestimulantes em períodos que antecedam os manejos mais intensos do processo de produção, para redução dos efeitos negativos do estresse.

O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas de estresse de tambaquis alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos após transporte em sistema fechado.

### **Material e Métodos**

Juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*, n=360; peso médio  $31,76 \pm 3,30$  g e comprimento total  $11,9 \pm 0,09$  cm) foram aclimatados em tanques com 310 L de capacidade, durante 30 dias, onde receberam ração comercial para peixes onívoros com 28% de proteína bruta (PB). Após esse período, foram divididos em dois experimentos. No experimento I, os peixes foram distribuídos em quinze tanques (n=15), perfazendo cinco tratamentos com três repetições para o  $\beta$ -glucano. No experimento II, os peixes foram distribuídos em nove tanques (n=15) correspondentes a três tratamentos com três repetições para os nucleotídeos, ambos em delineamento inteiramente casualizado.

Os peixes foram alimentados com dieta (28% PB) suplementada com a preparação comercial de  $\beta$ -glucano (Betamune®, Biorigin, São Paulo, Brasil) nas concentrações de 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%  $\text{kg}^{-1}$  de dieta ou com a preparação de nucleotídeos (Hilyses®, ICC Ind.

Com. Exp. E Imp. Ltda) nas concentrações de 0, 0,2 e 0,5%, conforme recomendado na literatura (Ramadan & Atef, 1991; Low et al., 2003; Li et al., 2004). A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente, durante oito semanas. Nesse período, os parâmetros de qualidade de água como temperatura ( $27,39 \pm 2,17$  °C) e oxigênio dissolvido ( $6,20 \pm 1,05$  mg L<sup>-1</sup>) foram monitorados três vezes por semana, por meio de um monitor YSI 55, e quinzenalmente, foram avaliados pH ( $7,00 \pm 0,92$ ) com pHmetro Quimis Q400M2 e amônia total ( $0,35 \pm 0,26$  mg L<sup>-1</sup>) pelo método de endofenol.

### **Protocolo de transporte**

Os juvenis de tambaqui passaram por um período de 24 horas de privação alimentar antes do início do protocolo de transporte para depuração dos animais em tanques de 310 L, com fluxo de água constante. O transporte foi realizado em sistema fechado utilizando sacos plásticos com capacidade para 60L, nos quais foram adicionados 20L de água e posteriormente oxigênio puro. Foram transportados 12 peixes de cada tratamento com  $\beta$ -glucano ou nucleotídeos em cada saco plástico (três repetições). O transporte foi realizado por rodovia durante três horas. Após o transporte os peixes foram distribuídos igualmente em quinze tanques para o experimento com  $\beta$ -glucano e em nove tanques (um tanque por repetição) para o experimento com nucleotídeos, onde permaneceram por 48 horas, para amostragens periódicas.

Para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram colhidas amostras de sangue dos peixes pertencentes aos diferentes tratamentos com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos antes do transporte (AT; na caixa de depuração); depois do transporte (DT; logo após a abertura do saco de transporte) e 24, 48 horas depois do transporte (24DT e 48DT; no tanque onde os peixes foram colocados após o transporte). Em cada momento foram coletados três peixes de cada repetição, totalizando nove por amostragem; sendo estes peixes retirados das caixas para evitar estresse adicional.

### **Análises hematológicas e bioquímicas**

A avaliação das respostas de estresse foi realizada por meio de indicadores hematológicos e bioquímicos. Para isso, com os peixes previamente anestesiados (100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína), procedeu-se a coleta sanguínea mediante punção de vasos caudais com o auxílio de seringas heparinizadas, sendo o plasma separado por centrifugação (3.000 rpm, 10 minutos).

O cortisol foi determinado pela técnica de imunoenensaio enzimático por competição (EIA, Kit 55050, Human®) com leitura realizada em leitor de placa Biotrack II. A glicose sanguínea foi medida em leitor digital (Advantage™), cujo método foi validado para uso com tambaquis (Gomes et al., 2005). Os parâmetros hematológicos determinados foram hematócrito (Ht), depois da centrifugação do sangue (12.000 rpm, 10 minutos), em tubos microcapilares heparinizados, e posterior leitura em escala padronizada; concentração de hemoglobina (Hb), segundo o método da cianometahemoglobina; e contagem do número de eritrócitos (RBC), realizada em câmara de Neubauer, depois da diluição do sangue em solução de formol citrato. Equações hematimétricas (Acerete et al., 2004) foram utilizadas para determinação das constantes corpusculares, como o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

#### **Análise da atividade respiratória de leucócitos**

A análise da atividade respiratória de leucócitos foi realizada segundo metodologia descrita por Anderson & Siwicki (1995) e Biller (2008). Essa metodologia se baseia na determinação das espécies reativas ao oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo através de ensaio colorimétrico, o qual baseia-se na redução do corante “*nitroblue tetrazolium*” (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de “*formazan*” (Klein, 1990). Para isso, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL do corante “*nitroblue tetrazolium*” (NBT, Sigma, St Louis, MO, USA), cuja mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25 °C. Após, 50 µL da suspensão foi colocada em tubo de ensaio com 1 mL de *n*, *n*-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA), cuja mistura foi centrifugada a 3000g por 5 minutos. Na reação, o corante NBT é reduzido, visto que o DMF promove a lise da parede celular dos leucócitos e solubiliza os grânulos de *formazan*. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Unico, 2100) no comprimento de onda de 540 nm (Sahoo et al., 2005).

#### **Análise estatística**

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças obtidas entre as médias dos diferentes tratamentos foram estabelecidas por análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Zar, 1999).



## Resultados

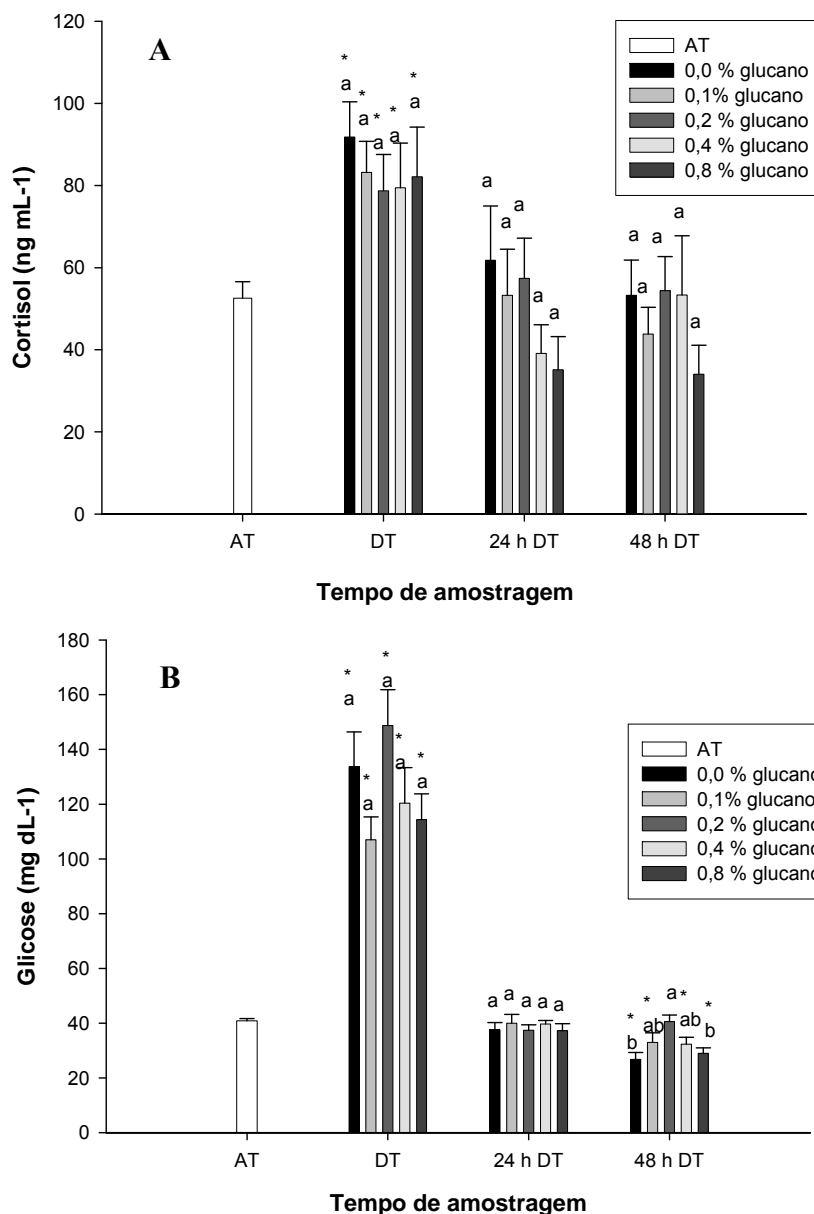
### Experimento I: $\beta$ -glucano

Não foi observada mortalidade dos tambaquis durante o período experimental.

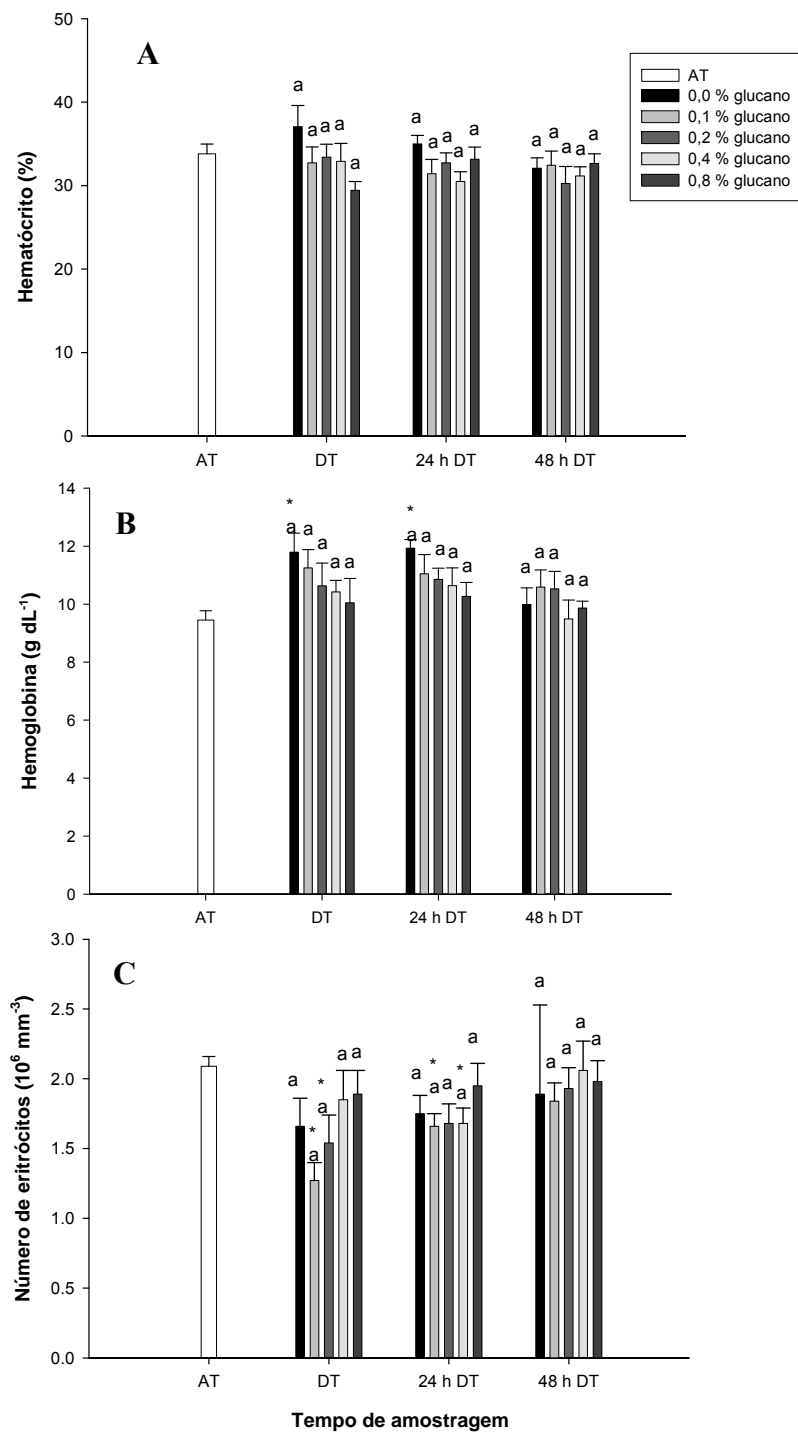
Os valores de cortisol plasmático não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos com  $\beta$ -glucano (Figura 1A). Entretanto, imediatamente após o transporte (DT), observou-se aumento significativo nos valores de cortisol em comparação ao tempo inicial (AT), sendo os maiores valores observados nos peixes alimentados com dieta isenta da suplementação de  $\beta$ -glucano. Após 24 horas, os valores retornaram a níveis próximos aos registrados no tempo AT (Figura 1A).

A glicemia não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, aumentando imediatamente após o transporte (DT) em comparação ao tempo inicial (AT) e retornando aos valores próximos aos observados antes do procedimento de transporte (AT) após 24 horas (Figura 1B). Decorridas 48 horas após o transporte, observou-se redução significativa nos valores de glicose nos peixes alimentados com dieta suplementada com 0,0 e 0,8 % de  $\beta$ -glucano em relação aos peixes alimentados com dieta suplementada com 0,2% de  $\beta$ -glucano, e nos tratamentos 0,0; 0,1; 0,4 e 0,8% de  $\beta$ -glucano houve diferença significativa nos níveis de glicose em comparação ao tempo inicial (Figura 1B).

Não foi observada diferença significativa para a porcentagem de hematócrito entre os tratamentos com  $\beta$ -glucano, assim como em relação ao tempo inicial (Figura 2A). Não houve diferença significativa para os valores de hemoglobina nos tempos imediatamente após o transporte (DT) e 24 horas após o transporte (24 h DT) entre os tratamentos com  $\beta$ -glucano. Contudo, observou-se aumento significativo nos valores desse indicador nos peixes alimentados com a dieta suplementada com 0,0 % de  $\beta$ -glucano imediatamente após o transporte (DT) e 24 horas após o transporte (24 h DT) quando comparado ao tempo inicial (AT) (Figura 2B). Para o número de eritrócitos não houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo DT, porém houve diferença significativa para o número de eritrócitos nos grupos alimentados com dieta suplementada de 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano em relação ao tempo inicial (AT). Após 24 horas, o número de eritrócitos retornou aos níveis próximos aos observados na condição inicial. Decorridas 24 horas do transporte, não houve diferença significativa entre os tratamentos, mas sim em relação ao tempo AT apenas nos tratamentos 0,1 e 0,4% de  $\beta$ -glucano. Em 48 horas não houve diferença significativa entre os diferentes níveis de suplementação com  $\beta$ -glucano (Figura 2C).



**Figura 1.** Cortisol plasmático (A) e glicemia (B) de tabaquais alimentados com  $\beta$ -glucano e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte). Letras diferentes demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os valores iniciais (AT) ( $n=9$ ).



**Figura 2.** Hematócrito (A), hemoglobina (B) e número de eritrócitos (C) de tabaquis alimentados com  $\beta$ -glucano e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte). Letras diferentes demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de

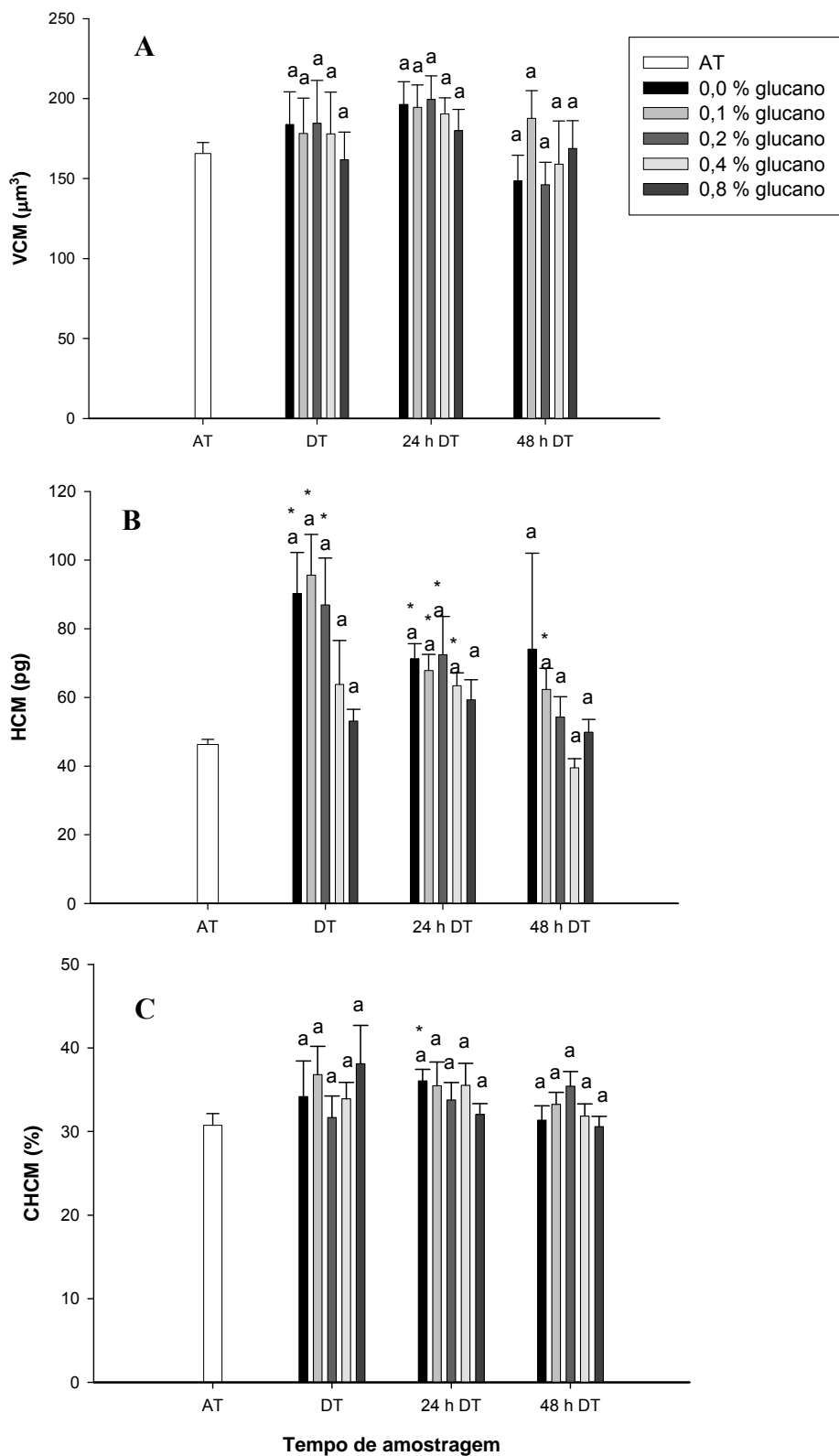
cada tempo de amostragem. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os valores iniciais (AT) (n=9).

O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos com  $\beta$ -glucano imediatamente após o transporte, assim como em 24 e 48 horas após o transporte (Figura 3A). Para a CHCM, observou-se, ainda, aumento nos valores dessa constante corpuscular no tratamento 0,0% de  $\beta$ -glucano em relação à condição inicial (AT) (Figura 3C). A hemoglobina corpuscular média (HCM) não apresentou diferença significativa em seus valores nos tempos DT e 24 h DT (Figura 3B). Em relação à condição inicial, observou-se aumento nos valores de HCM nos tratamentos 0,0; 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano no tempo DT, nos tratamentos 0,0; 0,1; 0,2 e 0,4 % de  $\beta$ -glucano no tempo 24 h DT e no tratamento 0,1% de  $\beta$ -glucano no tempo 48 h DT (Figura 3B).

## **Experimento II: Nucleotídeos**

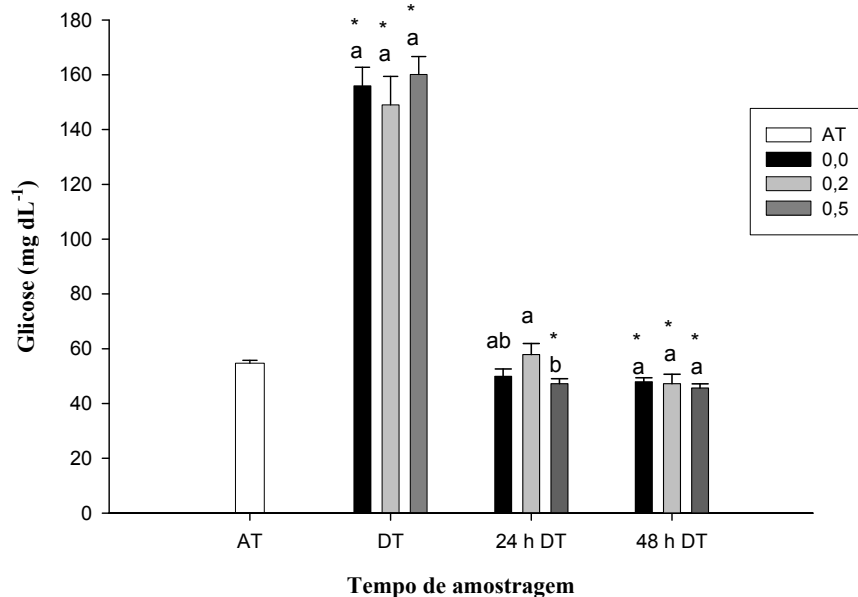
Não foi observada mortalidade durante o período experimental.

A glicemia não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, aumentando imediatamente após o transporte e retornando aos valores próximos aos observados antes do procedimento de transporte (AT), após 24 horas (Figura 4). No tempo de amostragem de 24 horas observou-se aumento significativo nos níveis de glicose nos peixes que receberam dieta suplementada com 0,2% de nucleotídeos em relação aos que receberam 0,5% de nucleotídeos, e neste último nível houve redução significativa nos valores de glicose em relação ao tempo AT (Figura 4). Em todos os tratamentos, após 48 horas do transporte, houve redução significativa nos valores de glicose em comparação ao verificado antes do transporte (AT) (Figura 4).



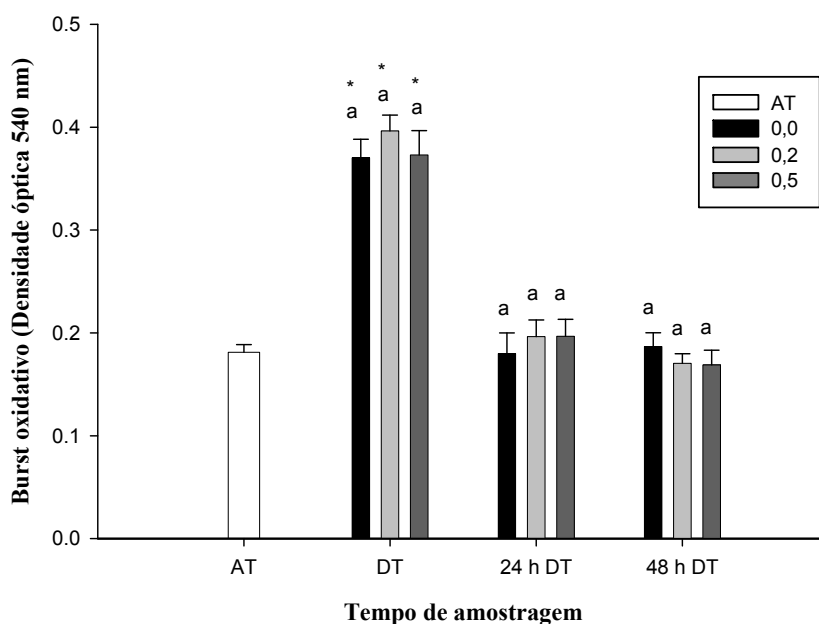
**Figura 3.** Volume corpuscular médio - VCM (A), hemoglobina corpuscular média – HCM (B) e concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM (C) de tabaquis

alimentados com  $\beta$ -glucano e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte). Letras diferentes demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os valores iniciais (AT) ( $n=9$ ).



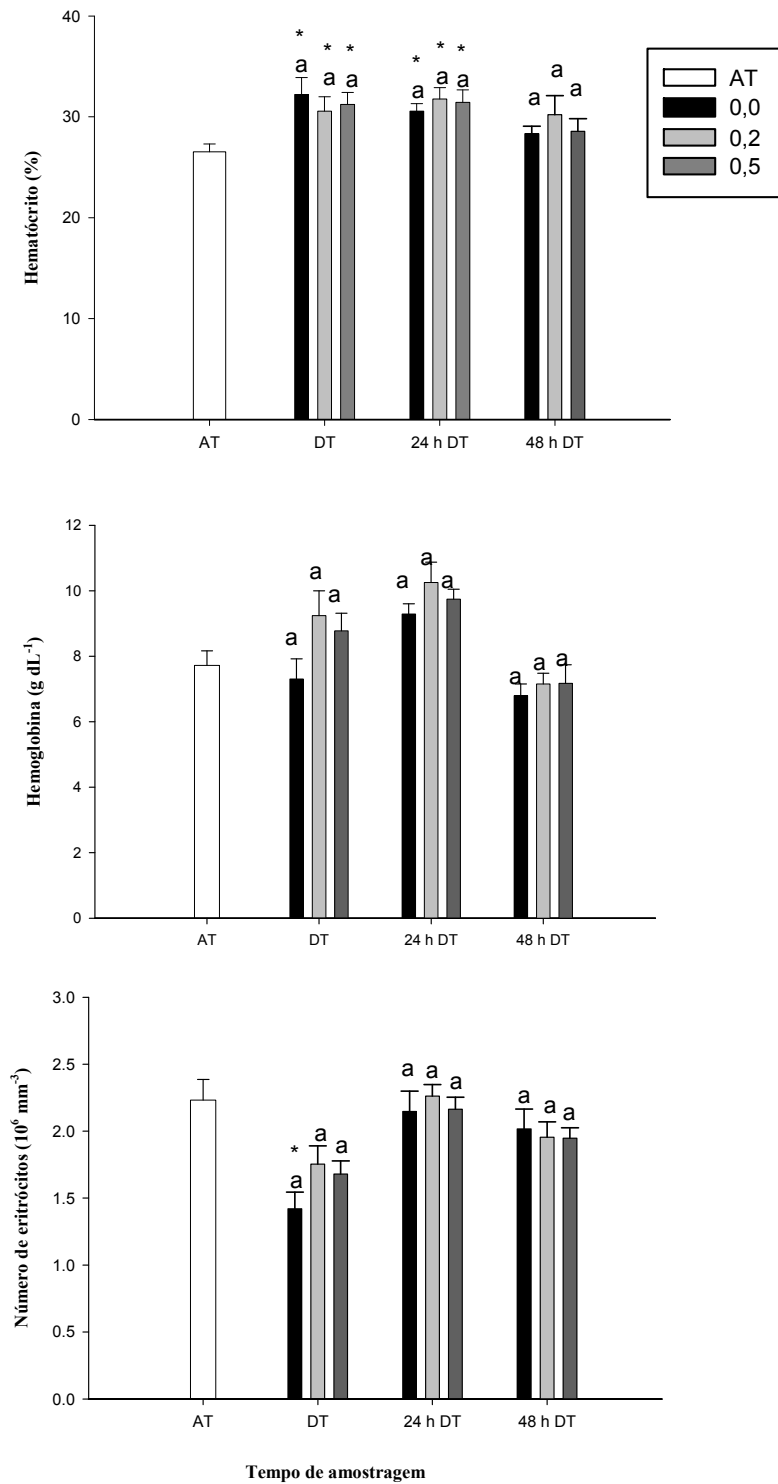
**Figura 4.** Glicemia de tambaquis alimentados com nucleotídeos e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte). Letras diferentes demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os valores iniciais (AT) ( $n=9$ ).

Os valores da atividade respiratória de leucócitos não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5). Entretanto, imediatamente após o transporte, observou-se aumento significativo nos valores de densidade óptica em comparação ao tempo inicial (AT), retornando aos valores próximos aos registrados no tempo AT, após 24 horas (Figura 5).



**Figura 5.** Atividade respiratória de leucócitos de tambaquís alimentados com nucleotídeos e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte). Letras diferentes demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os valores iniciais (AT) ( $n=9$ ).

Para a porcentagem de hematócrito não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (nível de suplementação de nucleotídeos), aumentando imediatamente após o transporte, permanecendo assim por até 24 horas pós-transporte. Entretanto, estes valores foram significativamente mais altos que aqueles observados nos peixes antes do início do transporte (AT). Após 48 horas, os valores de hematócrito voltaram aos níveis próximos daqueles registrados na condição inicial (Figura 6). Embora sem significância estatística em relação à condição inicial (AT), os valores de hemoglobina seguiram o mesmo padrão do hematócrito (Figura 6). Para o número de eritrócitos, assim como para o hematócrito e hemoglobina, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, sendo observada apenas redução no número de eritrócitos imediatamente após o transporte (DT), sendo os valores observados no grupo alimentado com dieta suplementada com 0,0% de nucleotídeos significativamente diferentes daqueles observados no momento AT (Figura 6).

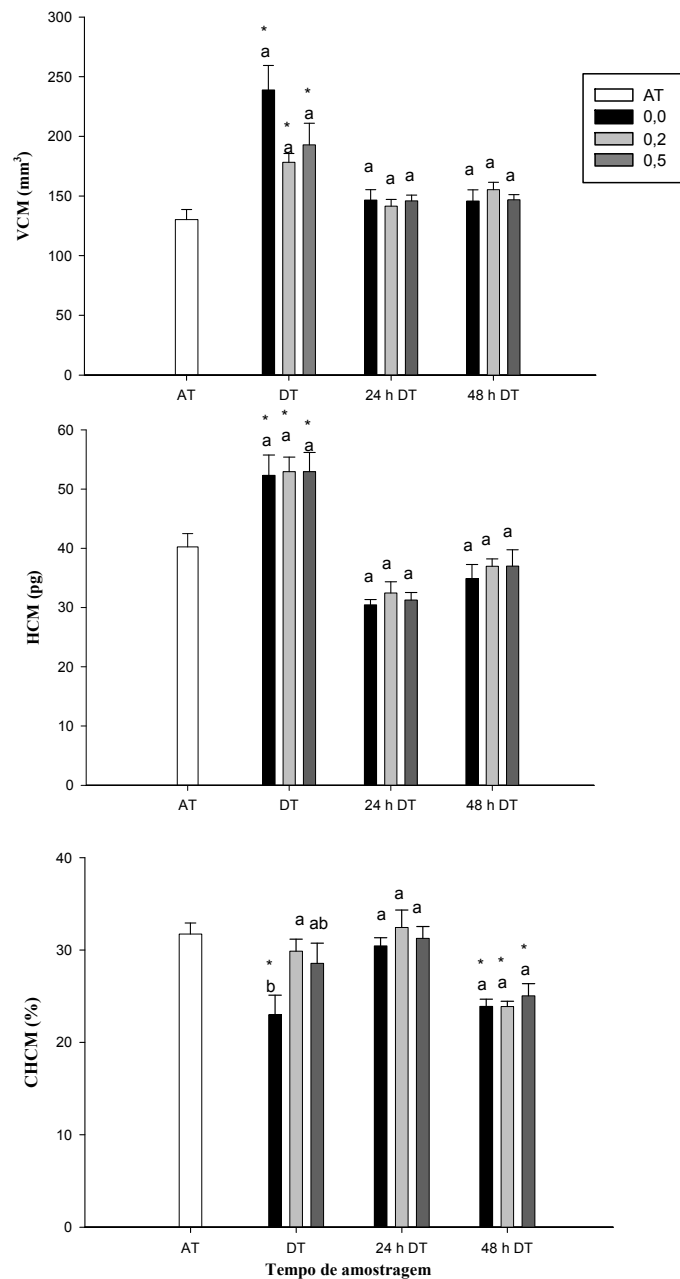


**Figura 6.** Hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos de tambaquis alimentados com nucleotídeos e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte). Letras diferentes



demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os valores iniciais (AT) (n=9).

Para as constantes corpusculares, volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) não houve diferença significativa entre os tratamentos, aumentando imediatamente após o transporte e retornando aos valores próximos aos observados antes do procedimento de transporte (AT), após 24 horas (Figura 7). Para a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi observada diferença significativa entre os tratamentos, no tempo DT, sendo os valores observados no grupo isento da suplementação de nucleotídeos significativamente menores que o observado no grupo alimentado com dieta suplementada com 0,2 % de nucleotídeos, assim como da condição inicial, grupo AT (Figura 7). Após 24 horas, os valores de CHCM voltaram aos níveis próximos ao observado na condição inicial (Figura 7). Em 48 horas, os valores de CHCM foram significativamente menores do que observado na condição inicial (Figura 7).



**Figura 7.** Volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular média – HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM de tabaquis alimentados com nucleotídeos e transportados por três horas em sistema fechado (AT = antes do transporte; DT = depois do transporte; 24 e 48 DT = 24 e 48 horas depois do transporte). Letras diferentes demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada tempo de

amostragem. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os valores iniciais (AT) (n=9).

### Discussão

O transporte de peixes é considerado um procedimento traumático que induz respostas de estresse em função da sucessão de estímulos adversos. Em espécies nativas como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pirarucu (*Arapaima gigas*), a matrinxã (*Brycon amazonicus*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e o jundiá (*Rhamdia quelen*) várias alterações hormonais, metabólicas, iônicas e hematológicas, em decorrência do estresse de transporte, foram registradas (Barcellos et al., 2001; Gomes et al., 2003; Gomes et al., 2006; Urbinati & Carneiro, 2006; Takahashi et al., 2006; Brandão et al., 2008; Fagundes & Urbinati, 2008; Carneiro et al., 2009).

O cortisol é um dos indicadores primários mais utilizados para a caracterização do estresse em peixes (Barton & Iwama, 1991; Acerete et al., 2004; Wendelaar Bonga, 1997; Brandão et al., 2006; Gomes et al., 2006). No experimento I com  $\beta$ -glucano, os níveis de cortisol aumentaram significativamente imediatamente após o transporte para todos os tratamentos, refletindo a resposta primária descrita por Iwama et al. (2004), sendo este resultado semelhante aos obtidos por Gomes et al. (2003) com tambaquis e por Urbinati & Carneiro (2006) com matrinxãs que apresentaram elevação do cortisol imediatamente após o transporte. Já em espécies como o pirarucu (*Arapaima gigas*), há grande latência nas respostas do cortisol, onde após o transporte este indicador permanece sem alteração e somente 24 h após o transporte é que ocorre a elevação dos níveis de cortisol, o que é atribuído, em parte, ao seu estilo de vida (Brandão et al., 2006; Gomes et al., 2006). No presente estudo, os tambaquis de todos os tratamentos com  $\beta$ -glucano apresentaram recuperação dos níveis iniciais de cortisol plasmático nas primeiras 24 horas após o transporte, demonstrando que o tambaqui pode reestabelecer sua condição normal relativamente rápido uma vez que o estresse agudo é removido.

Níveis elevados de glicose, relatados em várias espécies de peixes, é uma das respostas secundárias mais utilizadas para quantificação de estresse nestes organismos (Barton & Iwama, 1991; McDonald & Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). Neste estudo, a glicose sanguínea apresentou aumento significativo nos experimentos I e II em todos os tratamentos com  $\beta$ -glucano e nucleotídeos na amostragem DT, retornando para valores semelhantes aos observados no controle após 24 horas do transporte. Em resposta de estresse,

a mobilização da glicose ocorre como meio para fornecer energia extra ao animal, para que este possa superar o distúrbio imposto (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Após 48 horas, nos tratamentos com  $\beta$ -glucano, com exceção do grupo alimentado com dieta suplementada com 0,2%, e em todos os tratamentos com nucleotídeos houve redução significativa nos valores de glicose em relação à condição inicial, o que pode ser decorrente do jejum imposto aos animais nesse período de avaliação. No experimento I com  $\beta$ -glucano pode ser comprovado que a hiperglicemia observada foi mantida pelos altos níveis de cortisol registrados no momento DT, a qual é originada pela glicogenólise no fígado (Mommsen et al., 1999). A análise em conjunto do perfil de cortisol e glicose nos permite a compreensão da condição fisiológica dos peixes frente a uma situação de estresse, como o procedimento de transporte empregado neste estudo.

As análises hematológicas são utilizadas largamente na avaliação do estado de saúde de peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Tavares-Dias et al., 2009), sendo uma ferramenta complementar para quantificação do estresse ocasionado por práticas de manejo como o protocolo de transporte. No experimento I com  $\beta$ -glucano as alterações hematológicas observadas incluem elevação da concentração de hemoglobina nos peixes isentos da suplementação de  $\beta$ -glucano e da HCM nas concentrações de 0; 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano. O aumento da hemoglobina, por sua vez, sugere maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética do organismo em condição de estresse (Montero et al, 1999; Wojtaszek et al., 2002). No experimento II com nucleotídeos o aumento do hematócrito e do VCM em todos os tratamentos após o transporte, assim como a redução no número de eritrócitos no grupo isento da suplementação de nucleotídeos evidenciam que provavelmente houve distúrbios na homeostasia que pode ser decorrente de alterações na liberação de catecolaminas e cortisol, que promovem elevação dos valores de hematócrito, tanto devido ao aumento do volume dos eritrócitos quanto pelo aumento do número de eritrócitos circulantes (contração esplênica), com consequente elevação da concentração de hemoglobina (Soldatov, 1996; Mariano, 2006).

Neste estudo, houve elevação da atividade respiratória de leucócitos imediatamente após o transporte, independente do nível de suplementação de nucleotídeos na dieta do tambaqui. Alguns estudos verificaram que o aumento da fagocitose e da atividade respiratória em peixes pode ser decorrente do emprego de imunoestimulantes em suas dietas (Sakai et al., 2001; Selvaraj et al., 2006; Ai et al., 2007; Lin et al., 2009; Siwicki et al., 2009), como observado em garoupa que apresentou maior produção de anion superóxido ( $O_2^-$ ) de

leucócitos oriundos de peixes alimentados com dietas suplementadas com 1,5 g da mistura de nucleotídeos (Lin et al., 2009). Entretanto, após o evento estressante, como o transporte de trutas, a atividade respiratória de leucócitos foi inibida no grupo controle e nos peixes alimentados com altos níveis de imunoestimulantes (Volpatti et al., 1998). Estes resultados são contrários ao que foi observado com tambaquis, pois em todos os tratamentos incluindo o grupo isento da suplementação de nucleotídeos houve aumento da atividade respiratória de leucócitos imediatamente após o transporte, e esse aumento observado provavelmente possa indicar um elemento de defesa dos peixes contra patógenos ou corpo estranho. É relatado, ainda, que a fagocitose e a atividade respiratória de leucócitos podem ser afetadas por vários fatores como nutrientes, mudanças na condição ambiental e patógenos (Maita, 2007). Entretanto, neste estudo a suplementação de nucleotídeos na dieta do tambaqui não exerceu influência sobre a atividade respiratória de leucócitos, visto não haver diferença significativa entre os tratamentos nos diferentes momentos do procedimento de transporte.

Alguns estudos mostram que a administração de dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano é benéfica na prevenção dos efeitos negativos do estresse em peixes (Anderson, 1992; Volpati et al., 1998; Selvaraj et al., 2005), apresentando supressão das respostas primárias e secundárias do estresse de transporte em *Oncorhynchus mykiss* (Jeney et al., 1997). Por outro lado, em pacus expostos ao estresse de captura, observou-se que a administração do  $\beta$ -glucano, por injeção intraperitoneal ou adicionado à ração, não afetou os parâmetros hematológicos do pacu, e não minimizou as alterações provocadas pelo estresse (Abreu, 2007). Neste estudo, o emprego do  $\beta$ -glucano na dieta do tambaqui, da mesma forma que o observado com pacus, não minimizou as respostas de estresse na espécie. De forma semelhante, também não houve redução das respostas de estresse quando da suplementação da dieta do tambaqui com nucleotídeos, visto que não é conhecido se os nucleotídeos exógenos estão envolvidos na sinalização das vias associadas com as respostas de estresse ou se vários estressores têm efeitos específicos sobre o metabolismo de nucleotídeos nos peixes (Li & Gatlin III, 2006).

Os resultados deste estudo permitem concluir que o procedimento de transporte provocou estresse nos tambaquis e que as respostas fisiológicas de estresse ocorreram imediatamente após o transporte. Entretanto, a suplementação de  $\beta$ -glucano como a de nucleotídeos na dieta do tambaqui não foram eficientes em mitigar as respostas de estresse.

## Referências

- ABREU, J. S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com  $\beta$  1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura.** 2007. 123 f. Tese – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- ACERETE, L.; BALASCH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v.237, p.167-178, 2004.
- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394-402, 2007.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Disease**, v. 2, p. 281-307, 1992.
- 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.
- ARBELAÉZ-ROJAS, G. A.; FRACALOSSO, D. M.; FIM, J. I. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1059-1069, 2002.
- BARCELLOS, L. J. G.; WOEHL, V.; WASSERMANN, G. F.; QUEVEDO, R. M.; ITTZÉS, I.; KRIEGER, M. H. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish.. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 121-124, 2001.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, p. 12-18, 2000.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of cortivosteroids. **Annual Review of Fish Disease**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BARTON, B.A.; BOLLING, H.; HAUSKINS, B.; JANSEN, C.R. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns* x *S. platyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. **Comparative Biochemistry Physiology**. v. 126A, p. 125-134, 2000.

- BENDHACK, F.; URBINATI, E. C. Calcium sulfate as stress reducer in matrinxã *Brycon amazonicus* transportation. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, p. 201-205, 2009.
- BILLER, J. D. **Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano**. 2008. 114 f. Dissertação – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazônica**, v. 36, p. 349-356, 2006.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CRESCÊNCIO, R.; CARVALHO, E. S. Uso de sal durante o transporte de juvenis (1kg) de pirarucu (*Arapaima gigas*). **Acta Amazônica**, v. 38, p. 767-771, 2008.
- CARNEIRO, P. C. F.; KAISELER, P. H. S.; SWAROFSKY, E. A. C.; BALDISSEROTTO, B. Transporte f jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 283-288, 2009.
- CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T.E.H.P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 132-225.
- COOK, M.T., HAYBALL, P.J., HUTCHINSON, W., NOWAAK, B.F., HAYBALL, J.D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v.14, p. 333-345, 2003.
- DALMO, R. A.; BOGWALD, J. β-glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p. 384-396, 2008.
- FAGUNDES, M.; URBINATI, E. C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v. 276, p. 112-119, 2008.
- GATLIN III, D. M.; LI, P. Nucleotides. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. (Ed.). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. UK: Cromwell Press, p. 193-209, 2007.
- GOMES, L. C.; BRINN, R. P.; MARCON, J. L.; ARAÚJO, L. D.; BRANDÃO, F. R.; ABREU, J. S.; MCCOMB, D. M.; BALDISSEROTTO, B. Using Efinol L during transportation of marbled hatchetfish (Günther). **Aquaculture Research**, v. 39, p. 1292-1298, 2008.

GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R.; COPPATI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v. 256, p. 521-528, 2006.

GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; CRECÊNCIO, R.; PESSOA, M. A.; SILVA, A. L. F.; CARVALHO, E. S.; ANDRADE-JUNIOR, G.; BRITO, M. V. T.; PORTO, M. S. A. Validation of a simple portable instrument for measurement of blood glucose in four Amazon fishes. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 20, p. 101-109, 2005.

GOMES, L.C.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R., CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 34, p. 76-84, 2003.

IWAMA, G.; AFONSO, L.; MATHILAKATH, V. **Stress in fish**. Campbell River, AquaNet Workshop on Fish Welfare. 278p, 2004.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v. 154, p. 1-15, 1997.

LI, P.; LEWIS, D. H.; GATLIN III, D. M. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 561-569, 2004.

LI, P.; GATLIN III, D. M. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v. 251, p. 141-152, 2006.

LIN, Y. H.; WANG, H.; SHIAU, S. Y. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v. 15, p. 117-122, 2009.

LOW, C.; WADSWORTH, S.; BURRELS, C.; SECOMBES, C. J. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. **Aquaculture**, v. 221, p. 23-40, 2003.

MAITA, M. Fish health assessment. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D.M. (Ed.). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. UK: Cromwell Press, p. 10-34. 2007.

MARIANO, W. S. **Respostas fisiológicas e bioquímicas do Jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) a exposição aérea**. 2006. 72 f. Dissertação – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.



- MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed). **Stress and fish**. Academic Press, 1981. p. 49-76.
- McDONALD, D. G.; MILLIGAN, C. L. Ionic, osmotic and acidbase regulation in stress. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p.119-144.
- MELO, L.A.S.; IZEL, A.C.U.; RODRIGUES, F.M. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas**. Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 25p.
- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanism of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.
- MONTERO, D.; MARRERO, M.; IZQUIERDO, M.S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J.M.; TORT, L. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, v. 171, p. 269-278, 1999.
- RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: CRUZ -SUÁREZ, L.E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., OLVERA-NOVOA, M.A.; CIVERA-CERECEDO, R. (Eds.). **Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. Mérida, Yucatán, Mexico, 2000.
- RAMADAN, A.; ATEF, M. Effect of the biogenic performance enhancer (Ascogen "S") on growth rate of tilapia fish. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 87, p. 304-306, 1991.
- ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, p. 391-400, 1990.
- SAHOO, P. K.; KUMARI, J.; MISHRA, B. K. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, p. 151-155, 2005.
- SAKAI, M.; TANIGUCHI, K.; MAMOTO, K.; OGAWA, H.; TABATA, M. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, p. 433-438, 2001.
- SAKAI, M. Current research status of immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Adjuvant and immunostimulatory effects of  $\beta$ -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some

immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 15-24, 2006.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function and infection with *Aeromonas hydrophila*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 57, n. 1, p. 39-48, 2005.

SINK, T. D.; NEAL, J. W. Stress response and posttransport survival of Hybrid Striped Bass transported with or without clove oil. **North American Journal of Aquaculture**, v. 71, p. 267-275, 2009.

SIWICKI, A. K.; ZAKES, Z.; TERECH-MAJEWSKA, E.; KOWALSKA, A.; MALACZEWSKA, J. Supplementing the feed of pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)] juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 405-411, 2009.

SOLDATOV, A. A. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study. **Journal of Fish Biology**, v. 48, p. 321-328, 1996.

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

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, 143 p. 2004.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S. B.; JERÔNIMO, G. T.; SANT`ANA, A. R. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN-NETO, M.; POZZOBON-SORIA, W. S. (Eds.). **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009, p. 43-72.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrinxã to the stress of transport under influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 16, n. 1, p. 75-85, 2001.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P.C.F. Sodium chloride added to transport water and physiological responses of Matrinxã *Brycon amazonicus* (Teleost: Characidae). **Acta Amazônica**, v. 36, p. 569-572, 2006.

VAINIKKA, A.; JOKINEN, E.I.; KORTET, R.; PAUKKU, S.; PIRHONEN, J.; RANTALA, M.J.; TASKINEN, J. Effects of testosterone and  $\beta$ -glucan on immune functions in tench. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 348-361, 2005.

- VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHUEP, W., HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 409-424, 1998.
- VOLPATTI, D.; D'ANGELO, L.; JENEY, G.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P.; GALEOTTI, M. Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 14, p. 201-206, 1998.
- WEDEMEYER, G.A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C. B (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, p.35-72, 1997.
- WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. Chapman & Hall, New York, 1996.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.
- WOJTASZEK, J.; DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; LOZINSKA-GABSKA, M.; ADAMOWICZ, A.; DZUGAJ, A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, p. 176-183, 2002.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663p.

## **CAPÍTULO IV**

**Eficácia de uma vacina contra *Aeromonas hydrophila* para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano**

## RESUMO

*Aeromonas hydrophila* é um dos mais importantes patógenos oportunistas de peixes de água doce, causadora de septicemia hemorrágica, e é considerado um dos maiores problemas na criação de peixes nativos como o tambaqui. Assim, a prevenção de doenças na aquicultura pela utilização de vacinas torna-se cada vez mais importante. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito adjuvante do  $\beta$ -glucano na eficácia de uma vacina oleosa contra *Aeromonas hydrophila* para juvenis de tambaqui com base nas respostas hematológicas, na concentração e atividade da lisozima e resistência após o desafio com *A. hydrophila*. Para isso, os peixes foram alimentados com 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  dieta durante oito semanas. Após, foram divididos em dois grupos: vacinados e não vacinados. No grupo vacinado, os peixes foram imunizados intraperitonealmente com a bactéria atenuada e no controle injetados com PBS. Após vacinação, os peixes foram desafiados com a bactéria viva ( $1,0 \times 10^8$  UFC) e após quinze dias, procedeu-se a colheita sanguínea dos peixes sobreviventes para determinação dos parâmetros hematológicos e da concentração e atividade da lisozima. Os resultados mostram que a vacina oleosa contra *A. hydrophila* resultou em sobrevivência acima de 95% no tratamento com 0,2% de  $\beta$ -glucano e 100% de sobrevivência em todos os demais grupos alimentados com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano, conferindo boa proteção para os juvenis de tambaqui. A suplementação alimentar com  $\beta$ -glucano para o tambaqui e a sua imunização não interferiram nos parâmetros hematológicos (hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média) e bioquímicos (glicose, proteínas totais, albumina) avaliados após o desafio. Entretanto, com relação à hemoglobina e número de eritrócitos observou-se redução significativa nesses valores nos peixes que receberam a injeção de PBS em relação à vacina oleosa, caracterizando a ocorrência de anemia. Em relação à concentração e atividade de lisozima observou-se um aumento expressivo nos peixes vacinados e desafiados com *A. hydrophila* em relação aos não vacinados, com a maior porcentagem de aumento observada na concentração de 0,2% de  $\beta$ -glucano. Assim, o emprego de  $\beta$ -glucano na dieta do tambaqui não foi efetivo em aumentar a resposta imune não específica e potencializar o efeito da vacina contra *Aeromonas hydrophila*. Entretanto, a vacina oleosa administrada intraperitonealmente foi efetiva na prevenção de aeromoniose na espécie.

Palavras chave: Vacinação de peixes, tambaqui, imunoestimulantes, *Aeromonas hydrophila*.

## ABSTRACT

*Aeromonas hydrophila* is one of the most important opportunistic pathogens in freshwater fish. It causes hemorrhagic septicaemia, the most serious problem in native fish farms such as tambaqui. The prevention of disease in aquaculture by vaccines is very important. This study evaluated the adjuvant effect of  $\beta$ -glucan in the efficiency of oil vaccine against *Aeromonas hydrophila* to tambaqui juveniles in the hematological responses, the concentration and activity of lysozyme and resistance after the challenge with bacteria. Fish were fed 0; 0.1; 0.2; 0.4 and 0.8%  $\beta$ -glucan  $\text{kg}^{-1}$  diet during eight weeks. After, they were divided in two groups: vaccinated and non vaccinated. In the vaccinated group, fish were injected intraperitoneally with formalin-killed bacteria and the control group injected with PBS. After vaccination, fish were challenged with live bacteria ( $1.0 \times 10^8$  UFC) and after 15 days blood samples were taken from fish to investigate the hematological parameters and the concentration and activity of lysozyme. The results showed that the oil vaccine against *A. hydrophila* resulted in survival rate above 95% in the 0.2%  $\beta$ -glucan treatment and 100% survival rate in all other groups supplemented with  $\beta$ -glucan, indicating appropriate protection to tambaqui juvenile. The  $\beta$ -glucan supplementation and the immunization did not interfere in the hematological (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes number, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration) and biochemical (glucose, total protein, albumin) parameters evaluated after challenge. Hemoglobin and erythrocytes number were reduced in fish injected with PBS, showing the occurrence of anaemia. The concentration and activity of lysozyme was higher in vaccinated and challenged fish compared to those not vaccinated, being the highest level in fish supplemented with 0.2%  $\beta$ -glucan. The  $\beta$ -glucan supplementation to tambaqui did not effective in increase the non-specific immune response and the vaccine effectiveness against *Aeromonas hydrophila*. The oil vaccine injected intraperitoneally was effective in preventing *Aeromonas* disease in these fish species.

Key words: fish vaccination, tambaqui, immunostimulant, *Aeromonas hydrophila*.

## Introdução

A criação de espécies nativas vem crescendo nos últimos anos e no caso do tambaqui (*Colossoma macropomum*) sua criação tem se expandido nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (IBAMA, 2005), fato atribuído ao seu excelente potencial para produção intensiva (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Melo et al., 2001; Izel & Melo, 2004; Araújo-Lima & Gomes, 2005). Contudo, um dos principais problemas relacionados à sua criação é a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Malta et al., 2001, Silva, 2001).

Dentre os patógenos oportunistas de peixes de água doce, a bactéria *Aeromonas hydrophila* é um dos mais importantes, sendo causadora da septicemia hemorrágica (Merino et al., 1995; Austin & Austin, 1999; Kirov et al., 2002). Na profilaxia e tratamento desta doença, os antibióticos são utilizados indiscriminadamente. Contudo, o uso dessas drogas além de pouco eficiente ocasiona problemas como o desenvolvimento de bactérias resistentes e a ocorrência de resíduos de antibióticos nos tecidos de peixes comercializados (Buchman et al., 1992; Grant & Briggs, 1998; Smith et al., 2003; Sorum, 2006). Assim, muitos pesquisadores enfatizam o uso de imunoestimulantes e protocolos de vacinação (Sakai, 1999; Li & Gatlin III, 2006; Dalmo & Bogwald, 2008).

Na aquicultura as vacinas utilizadas consistem de preparações de bactérias vivas atenuadas, células mortas ou extratos celulares administrados aos peixes por injeção ou imersão (Gatlin III, 2002). Para o desenvolvimento eficiente destas vacinas há necessidade de se compreender os mecanismos básicos de proteção conferidos por vacinas inativadas e a imunidade induzida por vacinas de DNA. No caso de antígenos inativados, a maioria destes não induz resposta imune suficiente quando administrados na ausência de adjuvante (Dalmo & Bogwald, 2008). O uso de imunoestimulantes como adjuvantes aumenta a potência e eficácia da vacina, e no caso do emprego do  $\beta$ -glucano isso ocorre devido o aumento da produção de anticorpos contra proteínas de superfície das bactérias (Sherwood et al., 1987; Selvaraj et al., 2005; Whittington et al., 2005).

O uso de vacinas contra enfermidades bacterianas em peixes é uma realidade em vários países do mundo, principalmente no Chile, Noruega e Estados Unidos. Assim a pesquisa de imunização vacinal de peixes para controle de bacterioses é relevante, especialmente no caso de infecções causadas pelo grupo das *Aeromonas* móveis (Gudding et al., 1999).

No Brasil, os primeiros resultados com vacinação de peixes foram relatados por Pilarski (2006), que estudou o efeito da suplementação com vitamina C na eficácia da vacina

atenuada contra *Flavobacterium columnare* inoculada intraperitonealmente em tilápias do Nilo. Observou-se que a administração de 500 mg de ácido ascórbico/kg de ração potencializou o efeito da vacina, pois mitigou os efeitos nocivos do estresse, principalmente contribuindo para a redução de cortisol plasmático.

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito adjuvante do  $\beta$ -glucano na eficácia de uma vacina oleosa contra *Aeromonas hydrophila* para juvenis de tambaqui com base nas respostas hematológicas, na concentração e atividade da lisozima e resistência após o desafio com *A. hydrophila*.

## **Material e Métodos**

### **Delineamento experimental e manejo alimentar**

Juvenis de tambaqui (n=225; peso médio 28,65±0,49 g; comprimento total 12,14±0,07 cm) foram aclimatados em tanques de 310 L, durante 30 dias, recebendo ração comercial para peixes onívoros com 28% de proteína bruta (PB). Após esse período, foram distribuídos em 30 tanques (n=7), em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 com cinco níveis de suplementação de  $\beta$ -glucano (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% kg<sup>-1</sup> de dieta) e dois protocolos de vacinação (injeção com PBS e com vacina oleosa), totalizando 10 tratamentos com três repetições.

Os peixes foram alimentados com dieta (28% PB) suplementada com a preparação comercial de  $\beta$ -glucano (Betamune®, Biorigin, São Paulo, Brasil) em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% kg<sup>-1</sup> de dieta). A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente, durante 60 dias. Nesse período, os parâmetros de qualidade de água como temperatura (29,25 ± 0,06 °C) e oxigênio dissolvido (6,30 ± 0,02 mg L<sup>-1</sup>) foram monitorados três vezes por semana por meio de um monitor YSI 55, e quinzenalmente foram avaliadas a alcalinidade (191,09 ± 1,21 mg L<sup>-1</sup>) por titulação, pH (8,18 ± 0,006) com um pHmetro Quimis Q400M2 e amônia total (0,09 ± 0,004 mg L<sup>-1</sup>) pelo método de endofenol.

### **Isolamento da bactéria e infecção experimental**

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada neste estudo foi fornecida pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp. A cepa foi mantida congelada a -70 °C e no momento do uso, uma alíquota do isolado foi descongelada e o material semeado em caldo BHI (Brain Heart Infusion – Difco) em duplicata para incubação a 25° C, durante 48 horas.



Ensaio para estabelecimento da  $DL_{50}$ , dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais, foram conduzidos de acordo com a metodologia proposta por Plumb & Bowser (1983), utilizando as concentrações de  $10^5$ - $10^9$  unidade formadora de colônia (UFC) por peixe, sendo a  $DL_{50}$  estabelecida em  $1,0 \times 10^8$  UFC. Após o desafio, a mortalidade foi avaliada durante 15 dias. O diagnóstico de aeromoniose foi feito por meio do isolamento de *A. hydrophila* em cultura pura do rim cefálico e/ou quando foi registrada a ocorrência de sinais clínicos como: petéquias ao longo de toda a superfície corporal, distensão da cavidade abdominal por ascite, peixes isolados do cardume, coloração enegrecida, hemorragia nas nadadeiras e órgãos internos.

### **Produção da vacina**

A suspensão bacteriana utilizada como vacina foi produzida pelo cultivo de alíquota do isolado de *Aeromonas hydrophila* em 500 mL de meio líquido de Carlson & Pacha (1968) modificado por Pilarski et al. (2008), a 28°C, durante 48 horas.

A massa bacteriana foi obtida por centrifugação (4000 rpm, 4°C, por 20 minutos), após três lavagens sucessivas com solução de PBS estéril (pH 7,4) para retirada completa do meio de cultura e então foi ressuspensa em 100 ml de PBS. A concentração da vacina foi ajustada para  $1,0 \times 10^9$  células  $ml^{-1}$ .

Para inativação adicionou-se 0,5% de formol (volume/volume) à suspensão bacteriana, que ficou sob agitação constante a temperatura ambiente. Depois foi mantida a 4 °C, durante 24 horas, conforme metodologia de Grabowski et al. (2004).

À suspensão antigênica foi adicionado o adjuvante incompleto de Freund (na proporção de 1:1) e essa mistura foi emulsionada em misturador elétrico e mantida sobre refrigeração até o momento do uso.

### **Vacinação dos peixes e desafio bacteriano**

Após 60 dias de alimentação com as dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano, os peixes foram submetidos a dois protocolos de vacinação: vacinação oleosa e emprego de PBS. Assim, três grupos de peixes (21 peixes) de cada tratamento com  $\beta$ -glucano, totalizando 105 peixes, foram vacinados com duas doses da vacina, em intervalos de 15 dias, manualmente por injeção intraperitoneal da vacina oleosa. Outros 105 peixes dos mesmos tratamentos serviram como controle e receberam injeção intraperitoneal de PBS.

Com os peixes previamente anestesiados (100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína), procedeu-se a vacinação usando seringas de 1ml. A vacina de *Aeromonas hydrophila* (1 ml) foi injetada na cavidade peritoneal, um centímetro abaixo da nadadeira pélvica.

Decorridos quinze dias da vacinação e do reforço (“booster”), foi efetuado o desafio bacteriano por meio de injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila* (1,0 x 10<sup>8</sup> UFC). Após o desafio, os peixes foram observados a cada 12 horas durante quinze dias quanto a mortalidade e a ocorrência de sinais clínicos.

A eficácia da vacina foi determinada usando a porcentagem relativa de sobrevivência (do inglês, Relative Percent Survival - RPS) (Amend, 1981), sendo:

$$RPS = (1 - (\% \text{ mortalidade dos vacinados} / \% \text{ de mortalidade do controle})) \times 100$$

### **Procedimentos de coleta e análises fisiológicas**

A avaliação das respostas fisiológicas dos peixes foi realizada por meio de indicadores imunológicos e hematológicos. As amostragens foram realizadas após a realização da vacinação e desafio bacteriano com três peixes de cada repetição (nove de cada tratamento). Para isso, com os peixes previamente anestesiados (100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína), procedeu-se a coleta sanguínea mediante a punção de vasos caudais com seringas sem anticoagulante e o sangue foi separado em dois microtubos. Em um microtubo foi colocado o sangue com EDTA (anticoagulante) para determinação do eritrograma. Para obtenção do soro, no segundo microtubo foi colocado o sangue sem anticoagulante, o qual ficou em temperatura ambiente por cerca de duas horas para coagulação. Após esse período o soro foi separado por centrifugação (3000 rpm, 10 minutos a 10 °C) e armazenado a -70 °C.

### **Parâmetros hematológicos e bioquímicos**

Os parâmetros hematológicos determinados foram hematócrito (Ht), depois da centrifugação do sangue (12.000 g, 10 minutos), em tubos microcapilares heparinizados, e leitura em escala padronizada; concentração de hemoglobina (Hb), segundo o método da cianometá-hemoglobina; e contagem do número de eritrócitos (RBC), realizada em câmara de Neubauer, depois da diluição do sangue em solução de formol citrato. Equações hematimétricas (Acerete et al., 2004) foram utilizadas para determinação das constantes corpusculares, como o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Com relação aos parâmetros bioquímicos foram determinadas a glicemia (GL) pelo método de Trinder, a concentração de proteínas totais (PT) pelo método de biureto e de

albumina (AL) pelo método de verde de bromocresol, utilizando-se “kits” comerciais específicos (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Os valores de globulinas (GB) foram obtidos por meio de cálculo diferencial e a relação albumina:globulina (AL:GL) calculada a partir das concentrações de albumina e globulina.

### **Análise da concentração e atividade de lisozima**

As análises da concentração e atividade da lisozima foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), por ensaio turbidimético, segundo Ellis (1990) e adaptada por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreu (2007).

Uma curva padrão utilizando lisozima liofilizada (1mg/mL) de clara de ovo de galinha nas concentrações de 10, 25, 50, 80, 100 e 150 ng lisozima/300µL, suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10mg) e 50ml de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) foi preparada e lida em espectrofotômetro (Beckman DU-70S) em 450 nm. Os resultados das diferenças entre densidades óticas iniciais e finais foram utilizados para quantificação das concentrações de lisozima nas amostras.

Inicialmente as amostras de soro foram inativadas, em banho Maria, a 56 °C, durante 30 minutos, visando a inativação das proteínas do sistema complemento, de modo que a ação da lisozima fosse o único fator responsável pela lise do *Micrococcus lysodeikticus*.

As preparações consistiram de 175µL de soro inativado e 125µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), cuja mistura foi levada ao espectrofotômetro (Beckman DU-70S) para incubação durante dois minutos a 26°C. Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (300µL) foi adicionada à mistura, totalizando o volume final de 600µL, e avaliada a redução da densidade óptica ( $\Delta DO$ ) em 450nm, entre 0,5 e 5,0 minutos, a 26°C.

A concentração da lisozima (em µg/ml) corresponde a redução da  $\Delta DO$  para cada volume de amostra avaliada e a atividade da lisozima (em U/ml) corresponde a quantidade de enzima que produziu, em 450nm, um  $\Delta DO$  de 0,001/ minuto (Won et al., 2004).

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças obtidas entre as médias dos diferentes tratamentos foram estabelecidas por análise de variância (two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Zar, 1999).

## Resultados

A vacina oleosa com cepa da bactéria *Aeromonas hydrophila* injetada intaperitonealmente, sob condições laboratoriais, promoveu boa proteção para os tambaquis, acima de 95% de sobrevivência no grupo alimentado com ração suplementada com 0,2% de  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  de dieta e 100% de sobrevivência em todos os demais grupos (0; 0,1; 0,4 e 0,8 % de  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  de dieta) (Tabela 1). No grupo controle, a maior porcentagem de mortalidade, após o desafio, foi observada nos peixes não vacinados e que não receberam suplementação de  $\beta$ -glucano (19,05%) e nos grupos não vacinados que receberam 0,4 (38,1%) e 0,8% de  $\beta$ -glucano (38,1%) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Mortalidade de tambaquis, alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias, após vacinação e desafio com *Aeromonas hydrophila* (n=21).

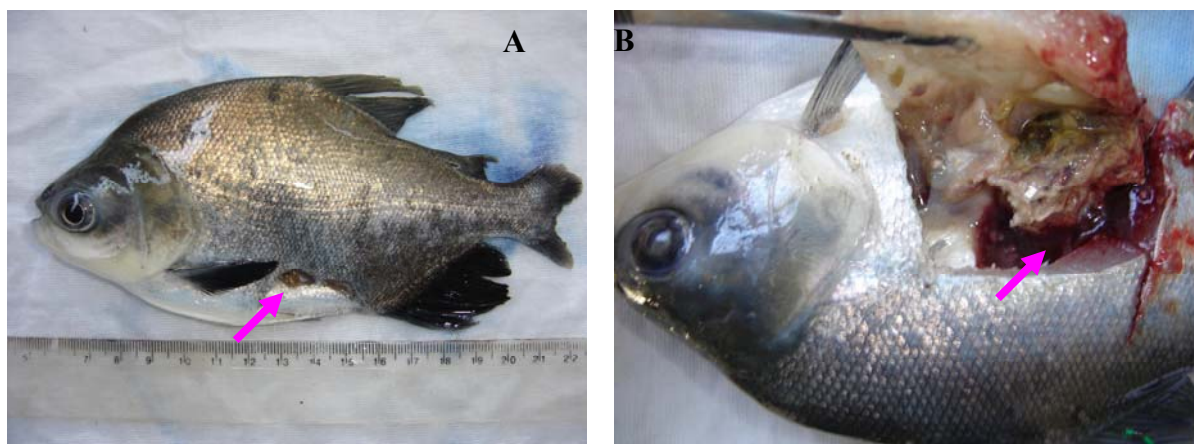
$\beta$ -glucano (%)	Protocolo de vacinação	Dose da vacina (UFC $\text{ml}^{-1}$ )	Mortalidade acumulada (%)
0,0	PBS	-	19,05
0,0	Vacina oleosa	$1,0 \times 10^9$	0
0,1	PBS	-	9,52
0,1	Vacina oleosa	$1,0 \times 10^9$	0
0,2	PBS	-	14,29
0,2	Vacina oleosa	$1,0 \times 10^9$	4,76
0,4	PBS	-	38,10
0,4	Vacina oleosa	$1,0 \times 10^9$	0
0,8	PBS	-	38,10
0,8	Vacina oleosa	$1,0 \times 10^9$	0

Com relação à porcentagem relativa de sobrevivência (RPS), observou-se que, com exceção do grupo alimentado com dieta suplementada com 0,2% de  $\beta$ -glucano que apresentou baixo RPS (66,69%), os demais apresentaram RPS de 100% (Tabela 2), indicando que a vacina promoveu proteção eficiente contra o desafio com *Aeromonas hydrophila*.

**Tabela 2.** Porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) de tambaquis alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano na dieta por 60 dias, após vacinação e desafio com *Aeromonas hydrophila*.

$\beta$ -glucano (%)	RPS (%)
0,0	100
0,1	100
0,2	66,69
0,4	100
0,8	100

Os peixes injetados com solução esterilizada de PBS e desafiados com *A. hydrophila* apresentaram após 24 horas sinais clínicos de aeromoniose, como isolamento de indivíduos do cardume, coloração enegrecida, hemorragia nas nadadeiras e órgãos internos, além de petéquias, lesões ulcerativas na superfície do corpo e distensão da cavidade abdominal por ascite (Figura 1).



**Figura 1.** Exemplos de tambaqui apresentando sinais clínicos de ocorrência de *A. hydrophila*. (A) lesões ulcerativas na superfície do corpo e (B) hemorragia de órgãos internos (Fonte: Sakabe, 2008).

Os parâmetros hematológicos (Ht, Hb, RBC, VCM, HCM e CHCM) avaliados após a vacinação e desafio bacteriano não apresentaram diferenças significativas nos peixes dos diferentes tratamentos com  $\beta$ -glucano (Tabela 3). Entretanto, quando comparados os protocolos de vacinação, observou-se que para as variáveis Hb e RBC houve redução significativa nos valores desses indicadores nos peixes que receberam a injeção de PBS em

comparação com os peixes que receberam a vacina oleosa, sendo observado o mesmo perfil para o Ht, porém sem diferença significativa (Tabela 3). Para as constantes corpusculares como VCM, HCM e CHCM não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de peixes que receberam injeção de PBS e aqueles que receberam a vacina oleosa (Tabela 3).

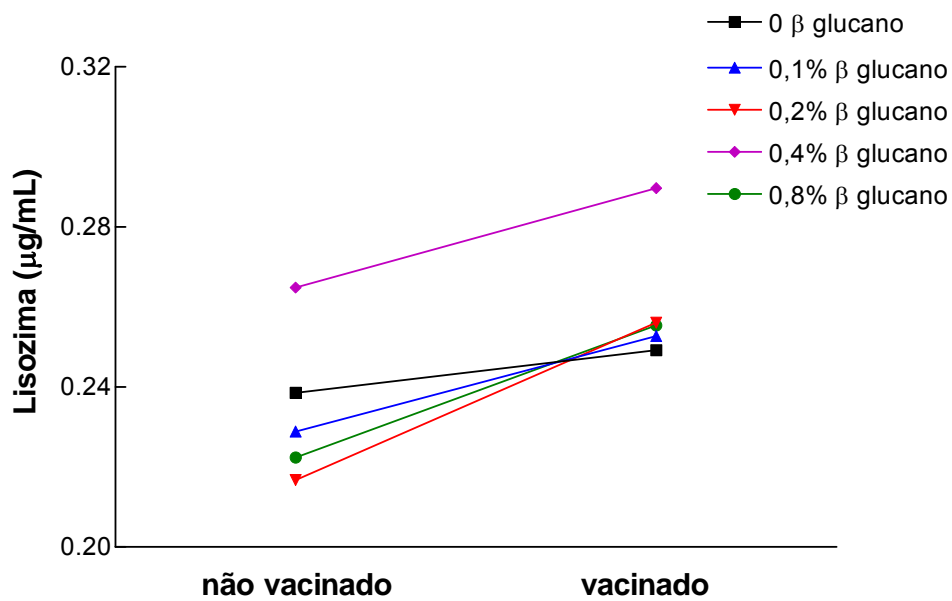
Com relação aos parâmetros bioquímicos, não foram observadas diferenças significativas em relação à glicemia, proteínas totais e albumina. Entretanto, nos peixes vacinados e desafiados com *A. hydrophila* a suplementação de 0,8% de  $\beta$ -glucano promoveu aumento nos valores de globulina, sendo este significativamente diferente dos valores observados nos grupos suplementados com 0,0 e 0,1% de  $\beta$ -glucano (Tabela 3). Para a relação albumina:globulina observou-se, nos peixes inoculados com PBS, redução nesses valores no grupo alimentado com dieta suplementada com 0,2% de  $\beta$ -glucano, cujos valores foram significativamente diferentes dos valores do grupo que recebeu 0,4% de  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  dieta (Tabela 3).

Após a vacinação e desafio bacteriano foi avaliada a concentração sérica e atividade de lisozima dos juvenis alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano. Os resultados mostraram que tanto a alimentação com  $\beta$ -glucano quanto a vacinação não exerceram efeito significativo para a concentração e atividade da lisozima (Figuras 2 e 3). As maiores concentrações e atividade de lisozima foram observadas no grupo vacinado e neste grupo os peixes que receberam suplementação com 0,4%  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  dieta foram os que apresentaram os maiores valores de concentração e atividade de lisozima ( $0,29 \pm 0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$  e  $47,58 \pm 6,92 \text{ U ml}^{-1}$ , respectivamente) (Figuras 2 e 3). Entretanto, após análise da porcentagem de aumento obtida para a concentração e atividade da lisozima dos peixes vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila* em relação aos não vacinados foi possível visualizar que o aumento mais expressivo na porcentagem da concentração e atividade da lisozima ocorreu nos peixes vacinados e alimentados com dieta suplementada com 0,2%  $\beta$ -glucano em relação aos demais tratamentos com  $\beta$ -glucano (Figuras 2 e 3). Com relação à concentração da lisozima sérica, os peixes vacinados e alimentados com dieta suplementada com 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% de  $\beta$ -glucano exibiram aumento de 4,49; 10,42; 18,13; 9,38 e 14,87%, respectivamente e para a atividade da lisozima a porcentagem de aumento foi de 4,85; 9,41; 15,8; 8,94 e 13,4%, respectivamente.

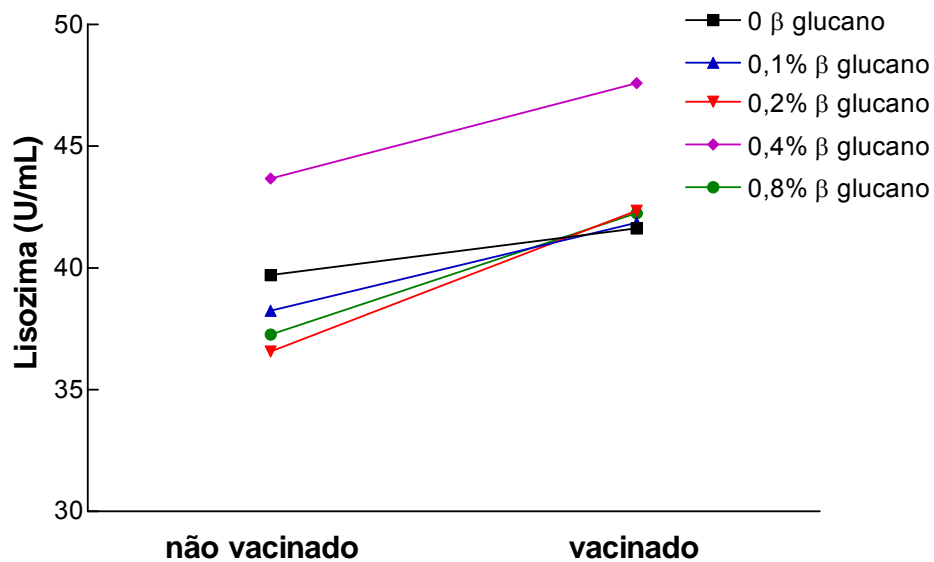
**Tabela 3.** Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaquis alimentados com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano após vacinação e desafio com *Aeromonas hydrophila*.

Parâmetros	Protocolo de vacinação	$\beta$ -Glucano (% kg <sup>-1</sup> dieta)				
		0,0	0,1	0,2	0,4	0,8
Ht (%)	PBS	25,56±1,84aA	23,33±2,52aA	25,00±2,60aA	25,22±1,95aA	21,78±2,30aA
	Vacina Oleosa	26,00±2,27aA	28,78±1,52aA	25,33±2,35aA	26,11±1,53aA	28,00±2,88aA
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	PBS	5,09±0,56aA	6,33±0,51aA	5,29±0,67aA	6,41±0,47aA	5,19±0,50aA
	Vacina Oleosa	5,91±0,17aB	6,92±0,30aB	6,28±0,39aB	6,88±0,40aB	6,88±0,62aB
RBC (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	PBS	1,81±0,19aA	1,84±0,22aA	1,72±0,19aA	2,14±0,26aA	2,06±0,20aA
	Vacina Oleosa	2,55±0,28aB	2,05±0,10aB	2,22±0,16aB	2,12±0,18aB	2,03±0,10aB
VCM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	PBS	149,47±14,35aA	143,37±23,46aA	153,97±17,47aA	136,38±20,90aA	109,58±9,18aA
	Vacina Oleosa	127,32±10,65aA	143,43±7,30aA	125,54±11,85aA	127,35±9,28aA	139,16±18,47aA
HCM (pg)	PBS	31,19±5,44aA	37,83±4,72aA	31,61±3,13aA	32,86±3,96aA	26,23±2,59aA
	Vacina Oleosa	29,40±2,96aA	32,99±0,95aA	30,16±2,31aA	31,43±2,63aA	30,44±3,07aA
CHCM (%)	PBS	21,85±3,85aA	30,48±5,59aA	22,32±2,71aA	26,19±2,30aA	25,34±3,09aA
	Vacina Oleosa	24,78±3,15aA	24,67±1,89aA	22,55±1,65aA	26,84±1,73aA	24,04±4,19aA
GL (mg dL <sup>-1</sup> )	PBS	83,06±6,93aA	75,14±3,55aA	84,01±6,88aA	82,05±3,21aA	72,44±4,45aA
	Vacina Oleosa	81,93±6,76aA	83,23±4,30aA	82,43±6,53aA	86,55±2,89aA	74,62±6,02aA
PT (g dL <sup>-1</sup> )	PBS	3,79±0,24aA	4,75±0,86aA	3,73±0,16aA	3,53±0,19aA	3,07±0,41aA
	Vacina Oleosa	3,49±0,15aA	3,78±0,25aA	3,56±0,08aA	3,86±0,17aA	4,11±0,36aA
AL (g dL <sup>-1</sup> )	PBS	1,22±0,11aA	1,19±0,09aA	1,13±0,05aA	1,34±0,10aA	1,10±0,08aA
	Vacina Oleosa	1,16±0,06aA	1,28±0,06aA	1,37±0,09aA	1,37±0,11aA	1,19±0,13aA
GB (g dL <sup>-1</sup> )	PBS	2,57±0,28aA	2,71±0,35aA	2,60±0,13aA	2,18±0,12aA	2,48±0,24aA
	Vacina Oleosa	2,32±0,13bA	2,50±0,23bA	2,20±0,11abA	2,50±0,15abA	3,32±0,50aA
AL: GL	PBS	0,53±0,09abA	0,50±0,07abA	0,44±0,02bA	0,62±0,03aA	0,49±0,04abA
	Vacina Oleosa	0,51±0,04aA	0,56±0,07aA	0,65±0,08aA	0,57±0,06aA	0,39±0,06aA

Médias seguidas por mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não apresentam diferença significativa em relação aos níveis de  $\beta$ -glucano e protocolo de vacinação (PBS e Vacina oleosa), a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



**Figura 2.** Concentração de lisozima sérica de juvenis de tambaqui vacinados (PBS e vacina oleosa) e desafiados com *Aeromonas hydrophila* após alimentação suplementada com diferentes concentrações de β-glucano por 60 dias. Não houve diferença significativa em relação aos níveis de β-glucano e protocolo de vacinação (PBS e Vacina oleosa), a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



**Figura 3.** Atividade de lisozima sérica de juvenis de tambaqui vacinados (PBS e vacina oleosa) e desafiados com *Aeromonas hydrophila* após suplementação de β-glucano em sua dieta por 60 dias. Não houve diferença significativa em relação aos níveis de β-glucano e protocolo de vacinação (PBS e Vacina oleosa), a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



## Discussão

Este estudo demonstrou a eficácia de uma vacina oleosa contra *Aeromonas hydrophila* para juvenis de tambaqui, onde a imunização com *A. hydrophila* promoveu menor mortalidade e maiores valores de RPS para os tambaquis. Entretanto, estes efeitos não foram aumentados quando do fornecimento de ração suplementada com  $\beta$ -glucano.

Alguns estudos conduzidos com  $\beta$ -glucano em peixes sugerem que a administração de dietas suplementadas com este imunoestimulante promove aumento da resistência de várias espécies de peixes contra infecções bacterianas e protozoárias (Raa et al., 1990; Nikl et al., 1993; Siwicki et al., 1994; Yoshida et al., 1995; Efthimiou, 1996; Robertsen, 1999). O modo pelo qual o  $\beta$ -glucano aumenta a resistência a doenças se dá pelo aumento dos mecanismos não-específicos de defesa, mais do que pelo aumento das respostas imunes específicas (Whittington et al., 2005). Neste estudo, após avaliação do desafio bacteriano observou-se um bom nível de proteção contra *A. hydrophila* em todos os grupos vacinados comparado ao grupo controle, sendo observada correlação positiva entre sobrevivência, porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) e nível de lisozima, independente do nível de  $\beta$ -glucano suplementado na dieta do tambaqui. Este padrão também foi observado quando do emprego de vacinas para carpas contra a bactéria *Aeromonas bestiarum* (Kozinska & Guz, 2004).

O efeito adjuvante do  $\beta$ -glucano sobre o aumento da potência e eficácia das vacinas tem sido relatado em peixes. Aakre et al. (1994) demonstraram que o salmão do Atlântico vacinado com *Aeromonas salmonicida* e  $\beta$ -glucano apresentaram aumento da resposta de anticorpos. Na espécie Catla, o emprego do  $\beta$ -glucano em protocolos de vacinação quando administrados por injeção resultou em aumento da resposta de anticorpos, proliferação específica do antígeno e “fator de ativação de macrófagos” (MAF) quando empregado como adjuvante em vacina de *A. hydrophila* inativada (Kamilya et al., 2006). Para a tilápia do Nilo, o emprego de uma vacina oleosa com cepa inativada de *Flavobacterium columnare* por injeção intraperitoneal e a suplementação de 0,1% de  $\beta$ -glucano foi eficaz para prevenir a ocorrência de columnariose (Pilarski et al., 2009). Entretanto, neste estudo não foi observado efeito adjuvante do  $\beta$ -glucano na vacina contra *Aeromonas hydrophila*, mas verificou-se boa resposta da imunização em tambaquis com aumento da proteção contra *A. hydrophila*. Em outro estudo com tilápia do Nilo, da mesma forma como observado para tambaquis, a imunização contra *S. iniae* aumentou significativamente a resposta de anticorpos, resultando em aumento da proteção dos peixes contra infecção por *S. iniae*, não sendo observado também aumento destes efeitos pela inclusão dietária do  $\beta$ -glucano (Whittington et al., 2005).

As análises hematológicas são largamente utilizadas na avaliação do estado de saúde dos peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Tavares-Dias et al., 2009). Neste estudo, a avaliação dos parâmetros hematológicos evidenciou uma redução nos valores do hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos, indicando a ocorrência de anemia normocítica normocrômica nos peixes que receberam injeção de PBS e foram desafiados com *A. hydrophila*, independente do nível de suplementação do  $\beta$ -glucano. Redução nos valores de hematócrito após desafio bacteriano também foi observada em pacus e tilápias do Nilo alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano (Falcon, 2007; Biller, 2008). Esse quadro se deve a ocorrência de hemorragias provocadas por essa bactéria (Campbell & Ellis, 2007), visto que as *Aeromonas* spp. produzem hemolisina e esta é a causa mais comum de anemia hemolítica em peixes (Groff & Zinkl, 1999). Para os parâmetros bioquímicos, o aumento nos valores de globulinas é relatado como mecanismo de defesa para os peixes (Sahoo & Mukherjee, 2001), cuja redução dos valores da relação albumina:globulina no grupo alimentado com dieta suplementada com 0,2% de  $\beta$ -glucano decorre do aumento da porcentagem de globulinas, embora não significativo, em tambaquis. De forma semelhante, Misra et al. (2006) relataram aumento da porcentagem de globulina em carpas indianas (*Labeo rohita*) alimentadas com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano. Sahoo & Mukherjee (2001) relatam o aumento de globulinas no soro como mecanismo de defesa para os peixes, havendo conseqüentemente uma redução na relação A:G em peixes suplementados com  $\beta$ -glucano na dieta.

Vários estudos relataram o efeito do  $\beta$ -glucano sobre as respostas imunes não-específicas. O  $\beta$ -glucano promove aumento na atividade de lisozima em salmão do Atlântico, truta arco-íris e turbot (Engstad et al., 1992; Jorgensen et al., 1993) e isto provavelmente se deva ao aumento no número de fagócitos secretando lisozima ou devido ao aumento da quantidade de lisozima sintetizada pela célula (Engstad et al., 1992; Kumari & Sahoo, 2006). Entretanto, para tilápia do Nilo foi observado que a atividade da lisozima não aumentou pela inclusão dietária de  $\beta$ -glucano (Whittington et al., 2005). Neste estudo, a concentração e atividade de lisozima não foram afetadas pelos diferentes níveis de suplementação com  $\beta$ -glucano na dieta do tambaqui. Entretanto, os maiores níveis de concentração e atividade da lisozima foram observados nos tambaquis vacinados em relação ao grupo controle e isso se deve em parte à inflamação produzida pela vacina oleosa, cujo mesmo padrão de resposta foi observado em carpas (Kozinska & Guz, 2004). Um expressivo aumento da concentração e atividade da lisozima, porém não significativo, foi observado nos tambaquis vacinados em relação aos não vacinados e que receberam dieta suplementada com 0,2% de  $\beta$ -glucano.

Aliado a este fato houve redução na taxa de sobrevivência e porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) dos tambaquis nestes grupos. Entretanto, essas alterações observadas podem ser decorrentes da própria resposta vacinal.

Neste estudo, o emprego de  $\beta$ -glucano na dieta do tambaqui não foi efetivo em aumentar a resposta imune não específica e potencializar o efeito da vacina contra *Aeromonas hydrophila*. Entretanto, a vacina oleosa administrada intraperitonealmente foi efetiva na prevenção de aeromoniose na espécie.

### Referências

- ABREU, J. S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com  $\beta$  1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura**. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.
- ACERETE, L.; BALASCH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v.237, p.167-178, 2004.
- AAKRE, R.; WERGELAND, H. I.; AASJORD, P. M.; ENDRESEN, C. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing h-1, 3-M-glucan as adjuvant. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, p. 47– 61, 1994.
- AMEND, D.F. Potency testing of fish vaccines. In: ANDERSON, D.P.; HENNESSEN, W. (Ed.). **Fish biologics: serodiagnostics and vaccines**. Development in biological standardization, vol. 49. Basel, Switzerland:Karger; 1981. p. 447-54.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 175-202.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 1998. 186 p.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Chichester: Springer Praxis, 3<sup>rd</sup> Edition. 1999. 459p.
- BILLER, J. D. **Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3  $\beta$ -glucano**. 2008. 114 f. Dissertação –

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

BUCHMANN, K.; ROEPSTORFF, A.; WALLER, P.J. Experimental selection of mebendazole-resistant gill monogeneans from the european eel, *Anguilla-Anguilla* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 15, p. 393-400, 1992.

CAMPBELL, T.; ELLIS, C. **Avian and exotic animal hematology and cytology**. New york: Wiley-Blackwell, 2007.

CARLSON, R.V.; PACHA, R.E. Procedure for the isolation and enumeration of myxobacteria from aquatic habitats. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 795-796, 1968.

DALMO, R. A.; BOGWALD, J.  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p. 384-396, 2008.

EFTHIMIOU, S. Dietary intake of h-1,3/1,6 glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae: effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 12, p. 1– 7, 1996.

ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B. (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications, 1990. p. 101-103.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, E.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, p. 287-297, 1992.

FALCON, D. R. **Nível de suplementação de 1,3  $\beta$ -glucano e vitamina C em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos**. 2007. 146 f. Tese – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

GATLIN III, D. M. Nutrition and fish health. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish Nutrition**. Elsevier, 2002. p. 671-701.

GRABOWSKI, L. D.; LaPATRA, S. E.; CAIN, K. D. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), following immunization with *Flavobacterium columnare*. **Journal of Fish Disease**, v. 27, p. 573-581, 2004.

GRANT, A.; BRIGGS, A. D. Use of ivermectin in marine fish farms: some concerns. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, p. 566-568, 1998.

GROFF, J. M.; ZINKL, J. G. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 2, p. 741-776, 1999.

GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 203-212, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Produção brasileira da Aqüicultura Continental, por Estado e espécie, para o ano de 2005**: Estatística da Aqüicultura e Pesca no Brasil – Ano 2005. Brasília: SEAP, 2005. 101 p.

IZEL A. C. U.; MELO, L. A. S. **Criar matrinxã: atividade econômica potencial para o agronegócio amazonense**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2004. 22 p.

JORGENSEN, J.B.; SHARP, J.E.; SECOMBES, C.J.; ROBERSEN, B. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, p. 267-277, 1993.

KAMILYA, D.; MAITI, T. K.; JOARDAR, S. N.; MAL, B. C. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 331-337, 2006.

KIROV, S.M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.T.; ODOVANOVA, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 547-555, 2002.

KOZINSKA, A.; GUZ, L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 437-445, 2004.

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

LI, P.; GATLIN III, D. M. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. **Aquaculture**, 251: 141-152, 2006.

MALTA, J.C.O.; GOMES, A.L.S.; ANDRADE, S.M.S.; VARELLA, A.M.B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* GOLVAN, 1956, (EOACANTHOCEPHALA, NEOECHINORHYNCHIDAE) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; POLIZELLO, A.C.; AZZOLINI, A.E.; LUCISANO-VALIM, Y.M. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunological Investigations**, v. 28, p. 89-101, 1999.

MELO, L.A.S.; IZEL, A.C.U.; RODRIGUES, F.M. **Criação de tambaqui (*Colossoma***

*macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 25p.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 157-168, 1995.

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

NIKL, L.; EVELYN, T.P.T.; ALBRIGHT, L.J. Trials with an orally and immersion-administered beta-1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 17, p. 191-196, 1993.

PILARSKI, F. **Imunização de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com antígeno obtido de *Flavobacterium columnare* e suplementação alimentar com vitamina C**. Tese de Doutorado – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2006. 118p.

PILARSKI, F.; CHAGAS, E. C.; VARANDAS, D. N.; SAKABE, R. Effect of  $\beta$ -glucan supplementation in the juvenile *Oreochromis niloticus* vaccinated against *Flavobacterium columnare*: non-specific immune parameters. In: WORLD AQUACULTURE, 2009. Veracruz. *Anais*. Veracruz: WORLD AQUACULTURE SOCIETY.

PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 631-637, 2008.

PLUMB, J.A.; BOWSER, P.R. **Microbial fish disease laboratory manual**. Alabama: Auburn University, Alabama Agriculture Experiment Station, 1983. 95 p.

RAA, J.; ROERSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, I. M., SUBASINGHE, R. P., ARTHUR, J. R. (Eds.). **Diseases in Asian Aquaculture**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1990, p. 39– 50.

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

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary 1,3  $\beta$ -glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced immunocompromised rohu *Labeo rohita* Hamilton. **Fish & Shellfish Immunology**, v.11, p.683-95, 2001.

- SAKAI, M. Current research status of immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.19, p.293-306, 2005.
- SHERWOOD, E. R.; WILLIAMS, D. L.; McNAME, R. B.; JONES, E. L.; BROWDER, I. W.; DI LUZIO, N. R. Enhancement of interleukin-1 and interleukin-2 production by soluble glucan. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 9, p. 261-267, 1987.
- SILVA, C.M.A. **Bactérias gram-negativas isoladas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas-Brasil**. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 41, p. 125– 139, 1994.
- SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 71-90, 2003.
- SORUM, H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: AARESTRUP, F.M. (Ed.). **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. Washigton DC: ASM Press, 2006. p. 213-238.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, 143 p. 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S. B.; JERÔNIMO, G. T.; SANT'ANA, A. R. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN-NETO, M.; POZZOBON-SORIA, W. S. (Eds.). **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009, p. 43-72.
- WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIOUS, P. H. Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, p. 217-225, 2005.
- WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIOUS, P. H. Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, p. 217-25, 2005.

WON, K.M.; KIM, S.M.; PARK, S.I. The effects of b-1,3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthyes olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology**, v. 17, p. 29-38, 2004.

YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. Augmentation of nonspecific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, p. 195–198, 1995.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663p.



## **CAPÍTULO V**

### **Considerações Finais**

## Considerações finais

Os imunostimulantes são reconhecidos por seu potencial para melhorar a função imune e aumentar a resistência a doenças, sendo uma alternativa ao uso de antibióticos na aquicultura. As pesquisas com imunostimulantes ainda são recentes na aquicultura mundial. No Brasil, as áreas de aplicação têm se expandido e o uso desses produtos na dieta das espécies nativas vem sendo avaliado. Contudo, algumas questões ainda necessitam ser elucidadas para obtenção de melhores respostas, visto que as informações disponíveis são muitas vezes contraditórias.

Estudos que contribuam para reforçar o entendimento do mecanismo de ação do sistema imune do tambaqui em condições adversas encontradas em sistemas de criação intensiva, quando da utilização da suplementação de imunostimulantes em sua dieta, são necessários, principalmente em função das divergências de resultados obtidos com as espécies nativas, havendo necessidade de padronização dos protocolos de administração, da quantidade de suplemento incorporada à dieta e da duração da administração para promoção da proteção dos peixes.

A prevenção de doenças na aquicultura pela utilização de vacinas torna-se cada vez mais necessária. No caso da *Aeromonas hydrophila*, que é um dos mais importantes patógenos oportunistas de peixes de água doce, o emprego de vacina oleosa administrada intraperitonealmente foi efetivo na prevenção de aeromoniose no tambaqui. Entretanto, protocolos avaliando o emprego de imunostimulantes como adjuvantes visando potencializar a eficácia da vacina necessitam ser revistos. Os estudos sobre vacinação de peixes são uma realidade em vários países do mundo, com grande potencial para pesquisa com espécies nativas. Entretanto, no Brasil esses estudos são escassos, especialmente com *Aeromonas hydrophila*, havendo necessidade de padronização das dosagens empregadas, vias de administração da vacina, custos e cepas utilizadas que devem ser específicas para cada região.

Assim, o estabelecimento de protocolos de imunostimulação que melhorem as condições de saúde dos peixes e o emprego de vacinas que contribuam para prevenir a ocorrência de doenças na criação, são etapas primordiais para o desenvolvimento da atividade, principalmente em condições intensivas.