

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**$\beta$ -glucano e vitamina C no desempenho produtivo  
e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de  
suplementação e tempo de administração**

**DARIO ROCHA FALCON**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Aqüicultura,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em  
Aqüicultura.

**Jaboticabal – São Paulo**

**Julho – 2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**$\beta$ -glucano e vitamina C no desempenho produtivo  
e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de  
suplementação e tempo de administração**

**DARIO ROCHA FALCON**

Zootecnista

Orientadora: Margarida Maria Barros

Co-orientador: Ricardo de Oliveira Orsi

**Jaboticabal – São Paulo**

**Julho – 2007**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

*Cleide da Rocha Falcon e Renato Sylvio Falcon,*

Minha eterna gratidão, admiração

e respeito pelo exemplo de dedicação, simplicidade, carinho e amor aos

valores da vida,...

Amo vocês

Ao meu amor *Shana Sampaio Sieber,*

inspiração e alegria de vida

Aos meus irmãos, *Rodrigo e Renata* pelo apoio

e amizade durante todos esses anos

Ao meu tio/irmão *João,* pelo carinho,

lição de vida, ... saudades.... (*em memória*)

Aos meus avós *Oswaldo e Oleme,*

pelo constante incentivo,

carinho e amor

Ao meu sobrinho *Murilo,*

que trouxe alegria a toda família

A minha tia *Cleunice* e minha prima *Carina,*

pela amizade e incentivo

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Margarida M. Barros, pela dedicação irrestrita, atenção, confiança e incentivo, amizade e ensinamentos;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, pelo incentivo, persistência e apoio em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela oportunidade e confiança, amizade, incentivo, sabedoria e exemplo profissional;

Ao Prof. Dr. Ari Fernandes Junior, pelo apoio irrestrito e persistência na condução das análises de identificação da bactéria;

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes e a Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabiana Pilarsk por disponibilizarem a cepa da bactéria *Aeromonas hydrophila* e prontamente nos auxiliarem no esclarecimento de dúvidas;

Ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino, pelo suporte e atenção com o nosso experimento e para com toda a equipe do AquaNutri;

A Dra. Andréia Belém Costa por gentilmente nos enviar material referente à bactéria *Aeromonas hydrophila*;

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Jane Megid e sua orientada Cristiane Nakada Nozaki por disponibilizarem o Laboratório do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública e reagentes para realizarmos alguns testes referentes às análises imunológicas;

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, Departamento de Bioestatística, pela orientação, atenção e auxílio na realização das análises estatísticas;

À Biorigin na pessoa de Rosangela Cristina Contieri, Vanderlei de Abreu e Mario Steinmetz, pela parceria, confiança, sugestões e apoio financeiro;

À Supre Mais na pessoa do Dr. José Eduardo Butolo por confeccionar o premix utilizado em nosso estudo;

À toda equipe do Laboratório de Nutrição de Peixes – AquaNutri; Igo, Xuxa, William, Altevir, Vivian, Gabriel, Blanca, Daniel, André e estagiários pelo exemplo, amizade e auxílio na realização desse trabalho. União e respeito acima de tudo. Obrigado pelas experiências compartilhadas;

Ao Centro de Aqüicultura da Unesp, através de seus docentes e funcionários, que me permitiu a realização dessa pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo;

Aos professores e funcionários do Departamento Melhoramento e Nutrição Animal pelo auxílio e amizade;

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação da FMVZ, Posto de Serviço Lageado, Carmen Sílvia de Oliveira Pólo e Seila Cristina Cassineli Vieira, pela amizade, atenção e auxílios prestados;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP, Botucatu, pela oportunidade e privilégio que tive em realizar o experimento nesta instituição;

Ao casal Talita e Cauê pela amizade e momentos compartilhados ao longo desses anos;

A futura cantora, dançarina e/ou até palhaça Tarsila pelo carinho, alegria e diversão a todo momento;

Aos meus amigos André (Bista), Julio (Pêra), Cecília (Virola), Márcio (Moscô), Leandro (Uerê), Ricardo (Loid), André (Gandola), Davi (Liso), Paulo (Jamoro), Hamilton Hisano, Fernanda (Wood), Danilo (Xanadu), Fabiola (Catota), Galetti (Loco), Iguana, aos amigos da republica Grão de Boi e especialmente para buana.

À minha companheira Shana Sampaio Sieber, pela amizade, companheirismo, paciência e oportunidade de sonhar ao seu lado, hoje e sempre amo você;

A todos os que de alguma maneira contribuíram com este trabalho...

**OBRIGADO!!!!**

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO I</b>	
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	01
1. Nutrição e Saúde de Peixes.....	02
2. Conceitos Básicos Sobre o Sistema Imune de Peixes.....	05
3. Imunoestimulante.....	23
4. Vitamina C.....	33
5. Estresse em Peixes.....	39
6. Referências Bibliográficas.....	51
Figura 1. Esquema representativo da resposta imune do peixe frente à invasão por patógenos.....	05
<b>CAPÍTULO II</b>	
NÍVEL DE SUPLEMENTAÇÃO DE $\beta$ -GLUCANO E VITAMINA C EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO: DESEMPENHO PRODUTIVO E PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS.....	73
Resumo.....	74
Abstract.....	75
Introdução.....	76
Material e métodos.....	77
Resultados.....	83
Discussão.....	86
Referências.....	94
Tabela 1. Percentual dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais.....	100
Tabela 2. Valores médios de ganho de peso por peixe (GPP), consumo aparente da dieta (CAD) e conversão alimentar aparente (CAA) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) durante 60 dias.....	101

Tabela 3. Valores médios inicial e final do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc) e taxa de hemoglobina (Hb) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio (frio) e desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> (bact)....	102
Tabela 4. Valores médios inicial e final do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), concentração de proteína plasmática total (PPT) e relação albumina-globulina (A:G) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio (frio) e desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> (bact).....	103
Tabela 5. Valores médios inicial e final do número de leucócitos totais (Leuc total), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr) e porcentagem de monócitos (Mon) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio (frio) e desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> (bact).....	104
Tabela 6. Valores médios inicial e final de intermediários reativos do oxigênio ( $H_2O_2$ ) e do nitrogênio (NO) produzidos por leucócitos sanguíneos de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio e desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	105
Tabela 7. Valores médios inicial e final de cortisol plasmático (Cortisol) e da concentração de vitamina C (Vit C) no fígado de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio.....	106
Tabela 8. Tabela 8. Mortalidade cumulativa e porcentagem de sobrevivência (SBV) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	107



### CAPÍTULO III

TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO DE $\beta$ -GLUCANO E VITAMINA C PARA TILÁPIA DO NILO: PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS.....	108
Resumo.....	109
Abstract.....	110
Introdução.....	111
Material e métodos.....	112
Resultados.....	119
Discussão.....	122
Referências.....	130
Figura 1. Amônia não ionizada ( $\mu\text{g/L}$ ) e pH da água durante o transporte de juvenis de tilápia do Nilo.....	136
Tabela 1. Percentual dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais.....	137
Tabela 2. Valores médios e desvio-padrão do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), concentração de proteína plasmática total (PPT), relação albumina-globulina (A:G), cortisol plasmático (Cort), glicose (Glic), número de leucócitos totais (Leuc total), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr), porcentagem de monócitos (Mon), intermediários reativos do oxigênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e do nitrogênio (NO) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com $\beta$ -glucano e vitamina C e submetido ao estímulo pelo frio.....	138
Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), concentração de proteína plasmática total (PPT), relação albumina-globulina (A:G), número de leucócitos totais (Leuc total), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr), porcentagem de monócitos (Mon), intermediários reativos do	

	oxigênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e do nitrogênio (NO) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com β-glucano e vitamina C e submetido a desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	139
Tabela 4.	Mortalidade cumulativa e porcentagem de sobrevivência (SBV) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com β-glucano e vitamina C e submetido a desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	140
Tabela 5.	Valores médios e desvio-padrão inicial (I), final (F), 24 e 72 horas do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com β-glucano e vitamina C e submetido a estresse por transporte.....	141
Tabela 6.	Valores médios e desvio-padrão inicial (I), final (F), 24 e 72 horas da concentração de proteína plasmática total (PPT), relação albumina-globulina (A:G), número de leucócitos totais (Leuc total), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr) e porcentagem de monócitos (Mon) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com β-glucano e vitamina C e submetido a estresse por transporte.....	142
Tabela 7.	Valores médios e desvio-padrão inicial (I), final (F), 24 e 72 horas da concentração de cortisol (Cort) e glicose (Glic) plasmáticos de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com β-glucano e vitamina C e submetido a estresse por transporte.....	143
Tabela 8.	Valores médios e desvio-padrão inicial (I), final (F), 24 e 72 horas da concentração de sódio sérico (Na), cloreto plasmático (Cl) potássio sérico (K) e amônia plasmática (NH <sub>3</sub> ) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com β-glucano e vitamina C e submetido a estresse por transporte.....	144

**CAPÍTULO IV**

IMPLICAÇÕES..... 145

## RESUMO GERAL

O presente projeto constou de dois estudos com o objetivo de avaliar a inter-relação entre o imunestimulante  $\beta$ -glucano e a vitamina C em dietas práticas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). No Estudo – I foi avaliado, após 60 dias experimentais (primeira fase), o melhor nível de suplementação do  $\beta$ -glucano (0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 % na dieta) e vitamina C (400 e 600 mg/kg da dieta) para desempenho produtivo, parâmetros hematológicos e imunológicos (determinação dos intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio), num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2, mais um tratamento controle sem suplementação do  $\beta$ -glucano e 125 mg de vitamina C/kg de dieta, totalizando nove tratamentos e quatro repetições. Após essa primeira fase, os peixes foram divididos em dois grupos. Um grupo foi submetido ao estímulo pelo frio e o outro ao desafio com *Aeromonas hydrophila*, avaliando-se os mesmos parâmetros da primeira fase, além da porcentagem de sobrevivência. No Estudo – II objetivou-se determinar o melhor tempo de administração de  $\beta$ -glucano e da vitamina C (45, 30, 15 e sete dias antecedendo os desafios) utilizando-se o melhor nível de inclusão do  $\beta$ -glucano e da vitamina C, obtidos no estudo I. Os desafios utilizados foram: estímulo pelo frio, estresse por transporte e desafio com *Aeromonas hydrophila*. Estes foram avaliados por meio dos mesmos parâmetros anteriores. Concluiu-se no estudo I que a suplementação de  $\beta$ -glucano e vitamina C não influenciam o desempenho produtivo da tilápia do Nilo; que a suplementação de 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta determina melhores respostas imunológicas frente ao estímulo pelo frio e desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila* e que, níveis elevados de suplementação de  $\beta$ -glucano (0,4 e 0,8%) promovem redução dos parâmetros imunológicos avaliados, independente da suplementação de vitamina C. No estudo II pode-se concluir que a alimentação com 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta durante 15 dias ou mais proporcionou aumento da resistência orgânica dos peixes frente ao estímulo pelo frio, estresse por transporte e desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila* e, que, a alimentação com essa dieta durante sete dias não foi suficiente para manter e/ou proporcionar manutenção dos parâmetros avaliados após juvenis de tilápia do Nilo serem submetidos a situações adversas.

Palavras-chave:  $\beta$ -glucano, *Saccharomyces cerevisiae*, imunestimulante, vitamina C, estresse, tilápia do Nilo, nutrição e saúde

# **CAPÍTULO I**

## **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

## **1. NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES**

Ao longo dos anos a produção de peixes vem se consolidando e ocupando maior espaço no mercado. Paralelamente a este aumento, a intensificação dos sistemas de produção demonstra para produtores, indústrias de ração e comunidade científica, em especial aos nutricionistas, que a produção fundamentada exclusivamente no rápido crescimento do animal não é suficiente para manter a atual produtividade sem afetar o meio e a resistência orgânica dos peixes, gerando impactos ambientais e econômicos para toda a cadeia produtiva.

Dessa maneira um novo conceito de balanceamento de rações vem se estabelecendo, com princípios pautados em nutrição, saúde e responsabilidade ambiental. Para tanto, as pesquisas científicas vêm agregando diferentes áreas com intuito de auxiliar o entendimento sobre o complexo binômio nutrição e saúde. Áreas como a hematologia e a imunologia têm auxiliado o entendimento da nutrição com intuito de promover novas estratégias para mitigar os efeitos do estresse e aumentar a resistência imunológica dos peixes, permitindo que o mesmo mantenha o equilíbrio orgânico, necessário nas diferentes e inevitáveis situações adversas a que estão expostos, nos atuais sistemas intensivos de produção.

Em sistemas extensivos de produção, os peixes estão constantemente expostos a fatores estressores; porém, convivem relativamente bem em função do estresse deste sistema ser menos intenso. Entretanto, nos sistemas intensivos de produção, os peixes são constantemente expostos a agentes estressores que podem determinar alterações da condição fisiológica, com diminuição da resistência orgânica.

Muitos são os fatores considerados estressores num processo de produção de peixes. Dentre esses fatores destaca-se a temperatura da água, que pode sofrer alterações abruptas, principalmente durante épocas de inverno e ainda os diferentes manejos exigidos neste sistema. Segundo Barton e Iwama (1991), o estresse pode afetar a resistência a doenças, crescimento, reprodução, sobrevivência e condição geral de saúde dos animais. Em função desses possíveis efeitos detrimenais, especial atenção tem sido dada à forma de se amenizarem essas conseqüências negativas.

A resposta do organismo a qualquer demanda que cause alteração da condição fisiológica do animal, além do estado normal de repouso, foi definido como estresse por Selye (1973). Embora a importância da nutrição para a manutenção da higidez dos peixes seja evidente e, vários estudos vêm sendo desenvolvidos, os questionamentos ainda superam os resultados conclusivos nesta linha de pesquisa (Barros et al., 2006).

Vários são os aspectos a serem avaliados numa ração, os quais, em função da participação metabólica, podem determinar o preparo do peixe para transpor situações adversas. Blazer (1992) destacou que nem sempre a ração que promove o rápido crescimento dos peixes é aquela que determina a melhor resistência à doenças.

Os peixes nem sempre adoecem e morrem quando são desafiados por agentes estressores. Normalmente, adaptam-se ao estresse por um período de tempo finito (Barton e Iwama, 1991). Durante este período, os peixes podem parecer normais; porém, estão depletando reservas e redirecionando energia em função das exigências extras impostas. Nesta condição, os peixes deixam de crescer e de se reproduzir e buscam retornar à condição de homeostase. Se há necessidade de redistribuição de energia, os animais devem estar preparados, principalmente, para prover energia, além de outros compostos como vitaminas e minerais que agirão como substrato para o correto funcionamento do sistema imunológico.

Segundo Blazer (1992), o potencial para o aumento da resistência a doenças nos peixes cultivados através da ração, certamente, existe. Entretanto, o mecanismo individual de resistência a doenças, somado aos efeitos de vários nutrientes e da inter-relação desses com os demais presentes na dieta, necessitam ser melhor estudados para se definir a ração que possa aumentar a resistência orgânica dos peixes (Barros et al., 2006).

O interesse no uso de substâncias imunoestimulantes em rações é profilático. A maioria dos microorganismos, que causam doenças em peixes, é descrita como oportunista, causando problemas quando os animais estão fracos e/ou estressados por condições adversas. Desta forma, tais compostos devem ser utilizados no período de produção, previamente à situações de manejo, mudança de temperatura e de ambiente, alta densidade de estocagem dentre outras.

Raa (1996) adverte que o conhecimento da ciência da imunoestimulação em peixes e o modo de ação e eficácia dos produtos, é fundamental para o sucesso desta prática. O autor ressalta, ainda, que o uso destes compostos está associado à dose e à forma de administração. Deve-se, ainda, considerar o tempo de administração e as possíveis diferenças de resposta existente entre espécies e fases de desenvolvimento.

A importância da suplementação de vitaminas também vem sendo destacada neste novo enfoque da nutrição de peixes, visto a necessidade de esclarecer se os valores descritos como necessários para prevenir sinais clínicos de deficiência, se mantêm em condições de sistemas intensivos de produção. Os estudos desenvolvidos até o momento não elucidaram esta questão, porém, está evidente o potencial de impacto de certos nutrientes no controle, por

meio da nutrição, da saúde dos peixes, como a suplementação de vitamina C (Barros et al., 2006).

Desta forma, o estado nutricional do animal em situações de estresse é consequência direta e indireta da quantidade e qualidade dos nutrientes presentes e disponíveis na ração. Assim, estratégias nutricionais que influenciem, positivamente, a saúde e resistência orgânica dos peixes vêm sendo desenvolvidas.



## 2. CONCEITOS BÁSICOS SOBRE O SISTEMA IMUNE DE PEIXES

Em termos gerais o sistema imune de peixes é similar ao dos vertebrados superiores, com algumas diferenças importantes. Nos últimos anos, as pesquisas sobre a fisiologia, filogenia e ontogenia do sistema imune de peixes vêm aumentando consideravelmente dentre as espécies destinadas à produção. Contudo, esse conhecimento ainda é escasso se comparado ao dos vertebrados superiores (Enane et al., 1993).

A resposta imune dos peixes pode ser dividida em dois tipos: resposta inata ou não específica, que consiste em impedir que os agentes patogênicos tenham acesso ao organismo hospedeiro, podendo eliminar os patógenos e bloquear sua entrada; a resposta imune específica, caracterizada pela especificidade e memória imunológica, induzida por substâncias denominadas imunógenos (Bernstein et al., 1998) (Figura 1).

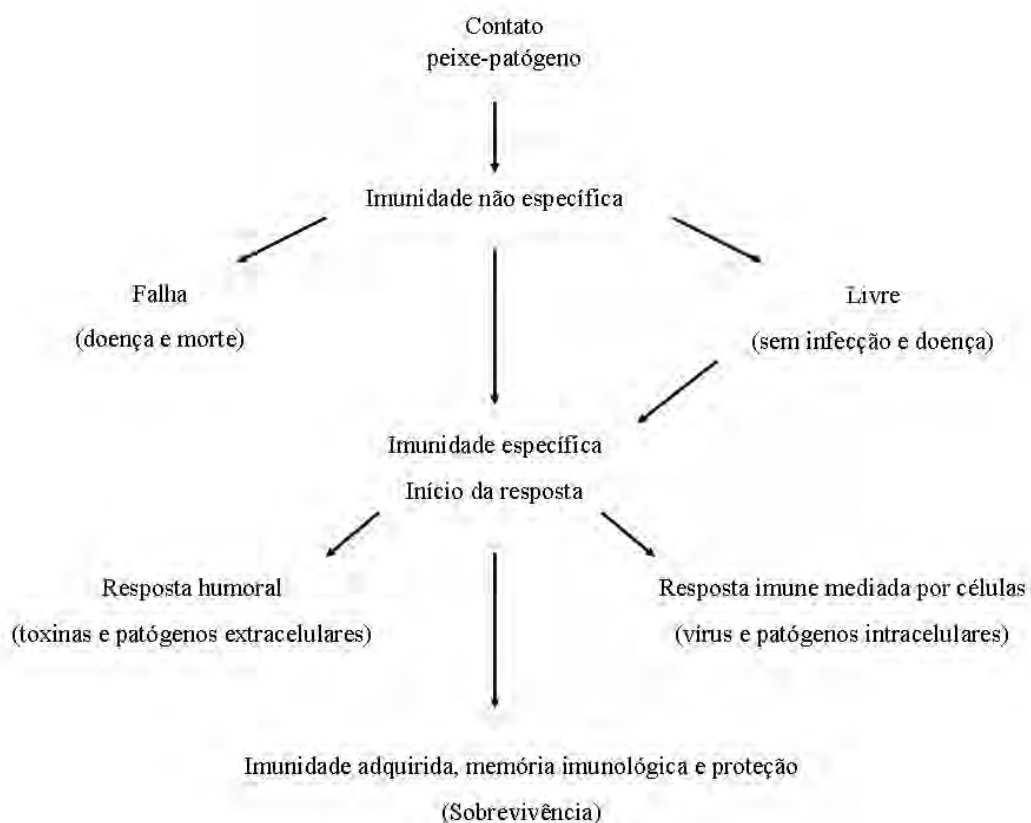


Figura 1. Esquema representativo da resposta imune do peixe frente à invasão por patógenos (adaptado de Shoemaker et al., 2001).

Segundo Bly e Clem (1994), o sistema imunitário não específico ou inato em peixes possui grande versatilidade, desempenhando papel importante na resposta imune, visto que o sistema específico responde lentamente quando comparado ao de mamíferos, principalmente em temperaturas da água abaixo da do conforto para a espécie.

Igualmente a outras espécies, os peixes são suscetíveis a doenças causadas por parasitos, vírus, bactérias e fungos, sendo a sobrevivência ou a morte destes, determinados pela eficácia do sistema imune em prevenir a infecção inicial e/ou prevenir o crescimento do agente patógeno após a infecção iniciada (Balfry e Higgs, 2001). Segundo Iwana e Nakanishi (1996), fatores celulares e humorais de ambos os sistemas, específico e não específico, promovem nos peixes proteção externa e interna contra agentes infecciosos. Apesar da distinção na classificação desses dois sistemas de defesa, deve-se entender que sempre que um agente patogênico ataca o organismo, este se defende mediante a interação da maioria dos elementos que compõem o sistema imune, onde vários fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação (Fernandez et al., 2002).

#### *TECIDOS E ÓRGÃOS QUE COMPÕE O SISTEMA IMUNE DE PEIXES*

Os órgãos do sistema linfóide dividem-se em órgãos primários e secundários, constituindo o rim e o timo como órgãos primários e, o baço e o tecido linfóide associado ao intestino, conhecido como GALT e as brânquias, como órgãos secundários.

Nos peixes teleósteos o rim desempenha papel equivalente ao da medula óssea nos vertebrados superiores, como órgão hematopoiético (Zapata et al., 1996). Este órgão linfóide é composto de uma porção anterior e uma posterior, ambas possuindo função hematopoiética, de forma mais eficiente no rim anterior, onde não aparece a função renal (Ellis e De Sousa, 1974; Zapata, 1979; 1981). O rim anterior é o primeiro órgão no qual aparece o linfócito B, sendo considerado órgão primário para a diferenciação dessas células.

O timo nos peixes, assim como nos vertebrados, constitui o local de desenvolvimento e maturação dos linfócitos T. Este órgão, com o avanço da idade do peixe, regride de tamanho, diminuindo sua atividade e, conseqüentemente, perdendo a sua função (Chilmonczyk, 1985). Ellsaesser et al. (1988) estudaram a evolução do timo de bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, ao longo de 16 meses e observaram regressão no tamanho e diminuição contínua da atividade desse órgão durante o decorrer do período avaliado. A funcionabilidade do timo nos peixes teleósteos permanece restrita, sendo que os experimentos se concentram nos efeitos da timentomia nos estágios iniciais a vida sobre a maturação do

sistema imune (Zapata e Cooper, 1990; Manning, 1994). Recentemente, foi encontrado em trutas arco-íris, *Salmo gairdneri*, alto nível da expressão dos genes ativadores da recombinase, essenciais na formação de receptores específicos para os linfócitos, demonstrando dessa maneira, que o timo também constitui um dos lugares de diferenciação desse tipo de célula (Razquin et al., 1990; Bernstein et al., 1998).

Os órgãos linfóides secundários organizam a resposta imune, tendo como função tornar as células brancas do sangue especializadas; assim, os linfócitos recirculam através do sangue e vasos linfáticos, num processo de vigilância imune (Tizard, 2002). O fígado nos vertebrados superiores também auxilia na função imune, sendo responsável pela produção de proteína C reativa e componentes que compõem a cascata de eventos desencadeada pelo sistema complemento. Assim, Fletcher (1981) estudando o mecanismo de defesa em peixes, inferiu que o fígado realiza papel similar ao descrito na literatura referente ao sistema imune de mamíferos.

Nos peixes, o muco e a pele agem como barreira natural contra a entrada de substâncias estranhas e patógenos. Estudos com bagre do canal demonstraram que o muco liberado pelos peixes contém moléculas que possuem ação imune, com destaque para lisozima, complemento e imunoglobulinas (Ourth, 1980).

### *CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE DE PEIXES*

Vários tipos de leucócitos participam da resposta celular, incluindo linfócitos, monócitos/macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas. Macrófagos e granulócitos são considerados células fagocíticas móveis, encontradas no sangue e nos tecidos linfóides secundários, sendo importantes em situações de inflamação, onde a resposta celular frente à invasão microbiana ou injúria tecidual, leva à migração de leucócitos e conseqüente acúmulo de fluído para o local de injúria (Secombes, 1996).

- *Linfócitos*

Os linfócitos são células altamente diferenciadas, com capacidade de resposta frente aos estímulos imunológicos (Ellis, 1977). Segundo Clem et al. (1991), os linfócitos de peixes possuem características e funções próximas às determinadas para animais superiores. Os mesmos circulam por todo o corpo através do sangue ou linfa, concentrando-se nos órgãos linfóides, podendo aparecer em outros tecidos afetados ou não por processos inflamatórios

(Peleteiro e Richards, 1985; Hibiya, 1994). Ainda são muito variados os dados sobre a porcentagem de linfócitos sanguíneos encontrados nos experimentos realizados com peixes, recebendo influência de muitos fatores, como espécie, condições de coleta e armazenamento do sangue e variações do ambiente (Fernandez et al., 2002). Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune, como as linfocinas (Yoshinaga et al., 1994). Os linfócitos se distinguem em dois grupos de populações chamados linfócitos B e T. Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória e participam da resposta imune humoral, enquanto os linfócitos T possuem diferentes tipos e desempenham funções específicas:

- Linfócitos T auxiliares: reconhecem antígenos (qualquer substância estranha que possa induzir resposta imune) específicos ligados à marcadores e liberam mensageiros químicos que estimulam a atividade de células como os fagócitos, os linfócitos B e outros linfócitos T;
- Linfócitos T citotóxicos: reconhecem e destroem células infectadas, quando ativos, migram para o local de infecção ou para o timo e segregam substâncias tóxicas que matam as células anormais;
- Linfócitos T supressores: por meio de mensageiros químicos, ajudam a moderar ou a suprimir a resposta imune quando a infecção já está controlada;
- Linfócitos T memória: vivem em estado inativo, mas respondem de imediato quando em contato posterior com o mesmo antígeno (Tizard, 2002).

- *Neutrófilos*

Os neutrófilos, ou células polimorfonucleares, são as primeiras células envolvidas nos estágios iniciais de inflamação nos peixes (Manning, 1994). Da mesma maneira que os macrófagos, eles podem ser isolados do sangue, tecidos linfóides e da cavidade peritoneal (Secombes, 1996). Assemelham-se aos neutrófilos dos mamíferos pelas características morfológicas e histoquímicas (Roberts, 1989). Estas células possuem a capacidade de fagocitar e, no transcorrer da resposta imune, a maioria possui o material ingerido no seu fagossomo. Hine (1992) em estudos sobre o efeito do complemento e opsonização sobre a estimulação da fagocitose e a produção do anion superóxido, inferiu que o neutrófilo possui

poder fagocítico assim como bactericida extracelular, similar aos encontrados em mamíferos.

Impreterivelmente, são os macrófagos que possuem a maior capacidade fagocítica, ingerindo grande quantidade de partículas (Suzuki, 1984). Entretanto, em infecções bacterianas, os neutrófilos podem estar em maior número no sangue. Outra função importante descrita é a atividade microbicida desencadeada durante o processo denominado “explosão respiratória”, que consiste na conversão do oxigênio molecular em compostos e metabólitos derivados do oxigênio, como radicais livres do oxigênio (Plyzycz et al., 1989).

Em situações de estresse, a quantidade dessas células pode aumentar significativamente, em 24 horas. Porém, pesquisas necessitam ser realizadas para descrever a exata função dessas células antes e após períodos de estresse em peixes. Segundo Secombes (1996), pesquisas vêm sendo realizadas para isolar populações puras de neutrófilos, com o intuito de determinar as reais funções dessas células em peixes.

- *Eosinófilo e basófilos*

Os eosinófilos se encontram distribuídos pelo tecido conectivo, especialmente no trato gastrointestinal e nas brânquias. A função dessa célula nos peixes não está totalmente esclarecida, estas intervêm nos processos de inflamação e na defesa celular mediante a degranulação, sendo encontrada na corrente sanguínea quando da infestação por parasitos. Os basófilos são considerados ausentes na maioria dos peixes (Hine, 1992).

- *Monócito/Macrófago*

São provavelmente as células mais importantes da resposta imune, não sendo importantes apenas pela produção de citocinas, mas também são as células primárias na apresentação dos antígenos em teleósteos. As células envolvidas na fagocitose e na destruição de patógenos, fazem o papel de interligar o sistema imune não específico ao específico, sendo isolados do sangue (monócitos), órgão linfóide (rim) ou da cavidade peritoneal (Vallejo et al., 1992; Shoemaker et al., 1997). Dentre as principais características destacam-se a capacidade de ingerir material estranho ao organismo, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos. Em sua superfície podem-se encontrar receptores para anticorpos e complemento, além de possuir a capacidade de expressar moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II, cuja função

básica é ligá-los aos linfócitos T auxiliares, onde este será apresentado ao antígeno (MacArthur e Fletcher, 1985; Blazer, 1991; Secombes e Fletcher, 1992).

- *Células citotóxicas*

Células citotóxicas não específicas em peixes são similares às células encontradas nos mamíferos, denominadas, exterminadoras naturais ou “*natural killer-NK*”. Sua função principal é lisar células estranhas ou infectadas por vírus sem que estas expressem algum antígeno ativador da resposta imune específica. Este tipo de resposta é chamada de resposta imune não específica, pois não há reconhecimento de epítomos (local na superfície de um antígeno que estimula a resposta imune específica e contra o qual se direciona a resposta) e nem formação de células monoclonais específicas ou qualquer memória imunológica.

O reconhecimento de células estranhas pelas células citotóxicas em peixes é mediada por meio de receptores de superfície, sendo dependente de energia para iniciar o processo de lise celular. Semelhantemente às células de mamíferos, as células citotóxicas de peixes utilizam alguns mecanismos na lise, como a fragmentação do DNA e necrose (Greenlee et al., 1991).

Vários fatores podem influenciar a capacidade de destruição dessas células em peixes, principalmente a dieta, a temperatura e o estresse. Estudos demonstraram alta atividade dessas células em peixes, destacando que, em condições de temperaturas abaixo do conforto térmico a atividade dessas células possui papel importante na resposta imune, principalmente quando a resposta específica (mediada por linfócitos) é fraca (LeMorvan-Rocher et al., 1995). Por outro lado, peixes submetidos a estresse mostraram supressão da atividade dessas células pela resposta dos linfócitos (Secombes, 1996).

### *SISTEMA COMPLEMENTO*

O sistema complemento é parte integral do sistema imune de defesa dos vertebrados, sendo considerado principal mediador plasmático do processo inflamatório. É constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como expressa na membrana celular e é ativado por duas vias: a clássica e a alternativa. Os peixes possuem o sistema complemento bem desenvolvido, semelhante ao dos vertebrados ectotérmicos. Segundo Matsuyama et al. (1988), a tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus*, possui as duas vias do sistema complemento, assim como o bagre do canal, salmão do Atlântico, *Salmo salar*, e truta arco-íris (Ourth e

Wilson, 1982; Nonaka et al., 1981; Roed et al., 1992, respectivamente).

O sistema complemento participa dos seguintes processos biológicos em peixes: fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas pelas bactérias (Secombes, 1996).

Para que exerça as suas funções, o sistema complemento deve ser ativado, originando assim uma série de fragmentos com diferentes características e funções específicas. Esta ativação ocorre em duas vias. Cada uma delas é desencadeada por fatores diferentes, sendo o início da ativação diferente para cada uma, mas que convergem em uma via comum a partir da formação do componente C3b do sistema complemento, desencadeando na formação do complexo lítico de membrana (CLM), que destrói células. Esse complexo liga-se à membrana das células-alvo e provoca a formação de "poros", que permitem o influxo descontrolado de água e íons, com turgência e lise celular subsequentes. Para controlar a atividade do sistema complemento, há inibidores endógenos regulados pela própria citólise (Tizard, 2002).

Koppnheffer (1987) enfatizou que a atividade bactericida nos peixes é decorrente principalmente da ativação da via alternativa. A ativação da via alternativa ocorre pela presença de certos agentes como certos fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos com determinadas características, especialmente a ausência de ácido siálico na membrana (Ourth e Bachinski, 1987). Esta via também pode ser ativada por outros fatores, como lipopolissacarídeos presentes em membranas de várias bactérias, proteínas da superfície viral e de parasitos. A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e imunoglobulinas agregadas.

### *SISTEMA IMUNE NÃO ESPECÍFICO*

Os processos de defesa não específicos constituem a imunidade inata ou natural, impedindo a entrada de agentes patogênicos em geral, ou destruindo-os se estes chegam a penetrar no corpo. Essa resposta pode ser de dois tipos: imunidade humoral e imunidade mediada por células ou imunidade celular.

O importante aspecto desse sistema é a falta de especificidade, obrigando que grande número de células sejam envolvidas ou se desloquem rapidamente para o local onde está o agente patogêneo. Dessa maneira, uma infecção subsequente com o mesmo agente patogêneo não irá propiciar a defesa mais rápida. Todavia, em um segundo contato com o mesmo patogêneo as células envolvidas na resposta imune não específica são capazes de interagir com

as células do sistema imune específico, sendo estimuladas por essas células e seus produtos (Secombes, 1996).

### *Imunidade celular*

Neste tipo de imunidade, várias células leucocitárias estão envolvidas, incluindo monócitos/macrófagos, granulócitos e células citotóxicas, importantes nos diferentes estágios de defesa não específica. A imunidade mediada por células é importante para a eliminação de patógenos intracelulares nos peixes. Basicamente, quando células estranhas entram no organismo do peixe, estas vão expressar na sua superfície o complexo de histocompatibilidade principal de classe I. Este complexo é um conjunto de proteínas presentes na superfície de todas as células nucleadas, responsáveis pela apresentação de epítomos. A expressão deste é ampliada pelo interferon gama liberado pelo linfócito auxiliar. Este é um mensageiro importante do sistema imune, enviando mensagem para o desencadeamento da lise das células estranhas ao organismo (Secombes, 1996).

Se antígenos penetrarem no corpo do peixe, alguns mecanismos de defesa tentarão destruí-los, a saber:

- Inflamação

Durante a resposta inflamatória três eventos principais ocorrem: aumento do fluxo sanguíneo para a área infectada, migração dos leucócitos da microcirculação para o tecido e a ação dos macrófagos ingerindo a célula estranha com liberação de potentes agentes microbicidas (Suzuki e Iida, 1992).

Em situações de inflamação aguda nos peixes estimulados experimentalmente ou de forma natural, foi determinado a ocorrência de neutrofilia e monocitose no sangue, além do acúmulo de neutrófilos e monócitos ao redor da área afetada (Roberts, 1989; Suzuki e Iida, 1992). Segundo Ellis (1986), a resposta celular ocorre geralmente em duas fases, especialmente quando o organismo está diante de potente agente patogênico, com aumento do número de neutrófilos sanguíneos e sua migração para o tecido, seguido pelo aparecimento de monócitos e macrófagos. Deve-se destacar que, em algumas situações, ocorre o aparecimento de neutrófilos imaturos no sangue, aumentando dessa forma o número dessa célula. Este fato é possivelmente resultado da migração de neutrófilos prontos para a área inflamada (Secombes, 1996). O autor destaca ainda que pode haver maior número de neutrófilos que



macrófagos, demonstrando assim a substancial contribuição dessas células frente a infecções bacterianas.

As lesões causadas no tecido do local infectado são agravadas principalmente pela liberação de enzimas extracelulares, podendo causar o aparecimento de hemorragia tecidual comumente observada em infecções bacterianas. Entretanto, lesões purulentas associadas à liberação de enzimas por neutrófilos degenerados não foram observadas em peixes. Após a infiltração celular e fagocitose do agente patogênico o tecido no local da inflamação começa a ser reparado, levando poucas horas para a epiderme cobrir o local afetado (Roberts, 1989).

Em situações onde o estímulo inflamatório não foi suficiente para eliminar o agente patogênico durante a resposta inflamatória aguda, inicia-se a resposta inflamatória crônica. Esta resposta consiste no aparecimento de linfócitos no local afetado, seguido pelo aumento do fluxo de macrófagos e concomitante monocitose. Entretanto, se as células inflamatórias não forem capazes de eliminar o agente agressor, os macrófagos se fundem e formam células gigantes, multinucleadas, ajudando, dessa forma, na formação dos granulomas, onde os macrófagos se modificam e viram células epitelióides, com grande atividade secretora e pouca atividade fagocítica. Elas secretam enzimas hidrolíticas que matam o ser estranho que está no granuloma (Ramakrishna et al., 1993).

A resposta inflamatória é controlada por vários mediadores, como citocinas, eicosanóides, fatores do sistema complemento e outros componentes vasoativos liberados pelos fagócitos, eosinófilos e trombócitos (Secombes, 1996).

- Fagocitose

A fagocitose significa “ingestão de alimento”, fagócito significa “célula que come” e macrófago “célula grande que come”. Os macrófagos serão atraídos pelos microorganismos e irão identificar se é um antígeno. Se este tem alto peso molecular, provavelmente não faz parte do mapa genético do organismo e será reconhecido pelo macrófago. Entretanto, se este estiver envolvido por um anticorpo, o macrófago irá identificá-lo mais rapidamente e fagocitá-lo imediatamente (Secombes, 1996).

Quando a imunoglobulina (envolvendo o antígeno) se ligar ao receptor específico de superfície do macrófago (FC $\gamma$ maR), irá desencadear uma série de reações químicas dentro do mesmo, fazendo-o acreditar que a substância é um antígeno verdadeiro, e então realizará rapidamente a emissão de pseudópodes para o englobamento. Após o englobamento do

antígeno, formará uma vesícula chamada de fagossoma que fica envolvido dentro do citossol. Os lisossomas que estão soltos no citoplasma contêm enzimas hidrolíticas que estão inativadas pelo pH relativamente alto. O fagossoma se une ao lisossoma e forma o fagolisossoma. O pH no fagolisossoma abaixa devido à entrada de prótons que vem do citoplasma. Essa acidez ativa as enzimas hidrolíticas que vão degradar o antígeno. Se o antígeno for uma bactéria, a morte é devido a ação de radicais livres derivados do oxigênio, como o superóxido, o peróxido de hidrogênio ou radical hidroxila que podem oxidar a membrana da bactéria. Dentre as enzimas hidrolíticas, destaca-se a fosfatase ácida e a lisozima. Esta última quebra a parede celular de peptideoglicano das bactérias gram positivas. Essa degradação, ocorrida dentro do fagolisossoma, é chamada de digestão intracelular. Ressalta-se que o interferon gama é uma citocina que vai estimular eficientemente a fusão do fagossoma com o lisossoma e é produzido por linfócitos T auxiliares. O interferon gama tem a função de estimular a fagocitose por meio desse mecanismo e também de estimular a expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe II. Os aminoácidos, açúcares monossacarídeos, íons, ATP e outras substâncias aproveitáveis saem pela membrana da vesícula. Porém, os peptídeos determinantes antigênicos (epítomos) são levados à superfície para se unir ao complexo de histocompatibilidade principal de classe II. Esta vesícula passa a se chamar de corpo residual e pode ser eliminada da célula por exocitose (Secombes, 1996).

Quando os fagócitos de peixes ingerem os microorganismos ocorre aumento no consumo de oxigênio independente da respiração mitocondrial, processo este denominado explosão respiratória, a qual produz radicais livres do oxigênio tóxicos para as bactérias e parasitas (Secombes, 1996). Vários fatores podem influenciar a produção desses reativos do oxigênio e nitrogênio em peixes, destacando-se a temperatura da água. Hardie et al. (1994) observaram, *in vitro*, diminuição na produção de reativos do oxigênio e nitrogênio de trutas arco-íris. Entretanto, a aclimatação dos peixes às baixas temperaturas não influenciou a produção em bagre do canal e truta arco-íris (Dexiang e Ainsworth, 1991; Hardie et al., 1994). Portanto, a produção do reativo do nitrogênio, óxido nítrico, em peixes necessita ser esclarecida (Secombes, 1996).

- Fagócitos como células acessórias

Em peixes existem duas maneiras pelas quais fagócitos podem funcionar como células acessórias: no englobamento e processamento do antígeno. Os mesmos apresentam, na sua

superfície, a associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II e os fagócitos podem secretar mediadores solúveis durante a ativação dos linfócitos, como a interleucina-1 (Ellsaesser e Clem, 1994). A associação dos fagócitos com os antígenos por meio dos receptores de superfície de ambas as células é fator importante para o perfeito funcionamento do sistema imune. Da mesma forma, a secreção de interleucina-1 pelas células dos peixes é importante na ativação dos linfócitos, os quais possuem receptores na sua superfície que reconhecem a interleucina-1, contribuindo para a proliferação celular (Secombes, 1996).

- Citotoxicidade não específica

Os leucócitos de muitas espécies de peixes possuem capacidade de apresentarem espontaneamente reações citotóxicas frente aos mais variados tipos de células estranhas, incluindo, célula infectada com vírus e parasitas. Este mecanismo é de fundamental importância para o sistema imune, constituindo outro componente da resposta imune não específica, sem a necessidade de período de indução ou memória celular. Ressalta-se que as células citotóxicas não específicas são encontradas nos órgãos linfóides, cavidade peritoneal e sangue de peixes, podendo estar presentes também no fígado, porém com pouca atividade citotóxica (Secombes, 1996).

### *Imunidade humoral*

O muco, soro e ovos de peixes contém grande variedade de substâncias não específicas que inibem o crescimento de microorganismos infecciosos. Estas substâncias são predominantemente proteínas e glicoproteínas, compreendendo na resposta humoral a lisozima, complemento, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina (Shoemaker et al., 2001).

- Lisozima

A lisozima apresenta atividade enzimática, traduzida na capacidade de catalisar a hidrólise das ligações  $\beta(1-4)$  entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina nas membranas externas de diversas espécies bacterianas gram-positivas. Ela digere certos carboidratos de alto peso molecular, assim como bactérias que contêm esses carboidratos na

estrutura de sua parede celular, as quais desintegram-se ou partem-se. A lisozima destrói o esqueleto glicano do peptidoglicano, ou seja, destrói a camada protetora de muitas bactérias. Grinde (1989) avaliou o efeito bactericida de dois tipos de lisozima (tipo I e II) frente a sete linhagens de bactérias. O autor relatou que, no caso de bactérias gram-negativas, diferentemente do que ocorre em vertebrados superiores, houve potente ação bactericida da lisozima tipo I. O autor inferiu que a lisozima de peixe age não apenas nas bactérias gram-positivas, mas também nas gram-negativas, na ausência do complemento.

Em peixes, a lisozima é distribuída principalmente em tecidos que possuam grande quantidade de leucócitos, assim como nos locais onde a probabilidade de ocorrer invasão bacteriana é alto, como pele, boca, brânquias, trato digestório e ovos (Oohara et al., 1991; Yousif et al., 1991). Segundo Murray e Fletcher (1976), a lisozima também pode ser encontrada em neutrófilos e monócitos, demonstrando dessa maneira a importância dessa enzima para os mecanismos de defesa imunológica dos peixes (Lie et al., 1989).

A atividade da lisozima, assim como de outros componentes do sistema imune de peixes, também sofre influência de fatores como estação do ano, sexo e estágio de maturação sexual (Fletcher et al., 1977). Porém, deve-se destacar que a temperatura da água e a condição de estresse, seja ela por manejo ou poluição, influenciam de maneira significativa em temperaturas abaixo do conforto para a espécie e/ou para peixes em condição de estresse, diminuindo a concentração de lisozima (Studnicka et al., 1986; Mock e Peters, 1990).

- Interferon

Os interferons são proteínas produzidas por certas células, principalmente quando atacadas por vírus ou por parasitos intracelulares. Estas proteínas não apresentam especificidade, pois podem inibir a replicação de diversos vírus. Os interferons difundem-se, entram na circulação e ligam-se à membrana citoplasmática de outras células, induzindo-as a produzir proteínas antivirais que inibem a replicação desses vírus. O interferon não é uma proteína antiviral, mas induz a célula a produzir moléculas protéicas antivirais.

### *SISTEMA IMUNE ESPECÍFICO*

A resposta imune específica apresenta como funções o reconhecimento do agente invasor como corpo estranho por células do sistema imune, culminando com a formação de anticorpos e memória imunológica. A imunidade específica refere-se à proteção que existe

num organismo hospedeiro quando este sofreu prévia exposição a determinados agentes e pode ser mediada por anticorpos (imunidade humoral) ou por células (Secombes, 1996).

### *Imunidade Celular*

Os linfócitos T têm capacidade para reconhecer alguns antígenos que se ligam a marcadores de superfície de certas células. Se uma bactéria for fagocitada pelo macrófago, os fragmentos resultantes da fagocitose ligam-se a marcadores superficiais desse macrófago que os apresenta aos linfócitos T. A exposição e ligação de linfócitos T com o antígeno específico estimulam sua proliferação.

### *Imunidade humoral*

Segundo Secombes (1996), quando um antígeno entra num organismo e chega a um órgão linfóide, estimula os linfócitos B que possuem na membrana receptores específicos para esse antígeno. Como resposta, os linfócitos B dividem-se e formam células que sofrem diferenciação, originando plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória. Os plasmócitos produzem anticorpos específicos para cada antígeno. Os anticorpos são posteriormente lançados no sangue e vão ao local da infecção. As células de memória ficam inativas, mas prontas a responder rapidamente, caso venha a acontecer posterior contacto com o antígeno. Os anticorpos atuam de três formas distintas:

- Ligam-se a toxinas bacterianas e levam à sua neutralização. As toxinas livres podem reagir com os receptores das células hospedeiras enquanto que o mesmo não acontece com o complexo anticorpo-toxina;
- Neutralizam completamente partículas virais e células bacterianas ligando-se a elas. O complexo anticorpo-antígeno é ingerido e degradado por macrófagos;
- A ativação do sistema complemento, via clássica, no âmbito da defesa específica, é feita por meio do revestimento de uma célula bacteriana por anticorpos. Esta interação antígeno-anticorpo ativa a primeira proteína do sistema complemento, culminando com a formação do complexo de ataque à membrana (formado pelos componentes C5b, C6, C7, C8 e C9 do complemento), induzindo a formação de poros e destruição da célula bacteriana. Além disso, os anticorpos e o fragmento C3b do sistema complemento atuam como opsoninas, estimulando a fagocitose do

antígeno.

O revestimento de antígenos por anticorpos é reconhecido como corpo estranho pelos fagócitos que os ingerem e destroem, processo esse denominado opsonização.

#### *FATORES QUE INFLUENCIAM A RESPOSTA IMUNE DE PEIXES*

Segundo Shoemaker et al. (2001), a resposta imune de peixes é afetada por vários fatores que influenciam sua intensidade, dentre os quais pode-se destacar:

- Genética: variação individual da resposta imune inata e específica;
- Ambiente: fotoperíodo, temperatura da água e estação do ano;
- Estresse: qualidade da água, poluição, densidade de estocagem e manejo de modo geral;
- Nutrição: qualidade e quantidade da dieta fornecida, fatores antinutricionais, concentração dos microingredientes e uso de imunostimulantes;
- Patógeno: nível de exposição, tipo (parasito, bactéria, vírus) e a virulência.

A temperatura ambiental é fator crítico no tocante ao desencadeamento da resposta não específica e específica em peixes. Temperatura abaixo do conforto térmico para a espécie pode causar imunossupressão na maioria dos peixes, uma vez que está integrada a alguns fatores como condições ambientais e resposta neuroendócrina. Bly e Clem (1991) demonstraram, *in vitro*, a ocorrência da imunossupressão em bagre do canal quando da exposição à baixas temperaturas. Experimentos conduzidos durante período de reprodução dos peixes associado à baixa temperatura demonstraram que a supressão foi influenciada por fatores endócrinos e de estresse, tais como elevado nível de esteróides sexuais e cortisol (Bly e Clem, 1994; Hutchinson e Manning, 1996).

A supressão do sistema imune inespecífico de peixes foi comprovada por Bly et al. (1997). Igualmente, Tort et al. (1998) descreveram que a temperatura abaixo do conforto para a espécie proporcionou a doença de inverno em dourada, *Sparus auratus*, que não se pode afirmar que foi causada por algum patógeno específico e sim pela supressão dos mediadores do sistema imune não específico, causando suscetibilidade a invasão por patógenos. Por outro lado, alguns peixes podem tornar-se tolerantes à mudanças ambientais, principalmente em relação à temperatura da água, como destacado em carpas, *Cyprinus carpio*, por Wishkovsky

e Avtalion (1982).

Na aquíicultura, a supressão da resposta imune também pode ser determinada pelo estresse de manejo. Este estresse e conseqüente supressão podem levar à predisposição à doenças e a entrada de patógenos oportunistas, levando a grande prejuízo na produção (Bly et al., 1997). Entretanto, este efeito pode estar diretamente relacionado à condição nutricional que se encontra o peixe e a espécie propriamente dita (Bly e Clem, 1994).

### *NUTRIÇÃO E RESPOSTA IMUNE*

A nutrição é fator importante na resistência orgânica e resposta imune nos animais (Shoemaker et al., 2001). Neste contexto, destacam-se os macro-ingredientes da dieta, lipídeos e proteínas, para a adequada resposta do sistema imune. Este necessita de aporte adequado de nutrientes para o seu bom funcionamento. Assim, a deficiência de aminoácidos específicos na dieta pode prejudicar a liberação de proteínas essenciais produzidas pelos linfócitos, macrófagos e sistema complemento, durante a infecção. A deficiência do aminoácido arginina na dieta pode diminuir a resposta imune, uma vez que o mesmo é precursor do óxido nítrico, composto liberado contra parasitos e micróbios em geral (Beisel, 1982; 1996).

Kiron et al. (1995) avaliaram em truta arco-íris a influência do fornecimento de dietas contendo níveis de proteína frente à resposta imune. Os autores observaram redução na atividade de lisozimas e proteína C-reativa nos peixes alimentados com 10,0% de proteína bruta (PB), em comparação aos que receberam dietas contendo 35,0 e 50,0% PB, respectivamente. Verificaram ainda, supressão do sistema imunológico dos peixes alimentados com a dieta contendo 50,0% PB, quando desafiados com o vírus da necrose hematopoética.

A estimulação *in vitro* de leucócitos de peixes por hidrolisados protéicos sugere que podem ser efetivos como suplemento alimentar, atuando na estimulação do sistema imune e melhorando a resistência à infecção (Gildberg et al., 1996). Entretanto, os resultados do uso de hidrolisados de proteínas adicionados à dieta para melhorar a resistência dos peixes são controversos, não demonstrando efeito significativo em salmão do Atlântico desafiado com *Aeromonas salmonicida*, bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua*, e juvenis de salmão “coho”, *Oncorhynchus kisutch*, desafiados com *Vibrio anguillarum* (Gildberg et al., 1995; Gildberg e Mikkelsen, 1998; Murray et al., 2003). Porém, segundo Murray et al. (2003), o tamanho da fração polipeptídica e a concentração do hidrolisado na dieta influenciam de forma positiva a

resposta do sistema imune de peixes.

A utilização de lipídeos na dieta para peixes pode, direta ou indiretamente, influenciar a resposta do sistema imune. Porém, devido à complexidade dessa inter-relação, o entendimento ainda não é claro (Maki e Newberne, 1992). Segundo Henderson e Tocher (1987), os peixes não sintetizam os ácidos graxos poliinsaturados das séries  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 e seus derivados metabólicos, os quais são nutrientes essenciais e devem, portanto, ser supridos pela dieta de acordo com a exigência da espécie. Higgs e Dong (2000) afirmaram que tais ácidos graxos poliinsaturados são importantes na resposta imune e em situações adversas às quais os peixes de sistemas intensivos de produção estão sujeitos.

Lim e Webster (2001) relataram três mecanismos pelos quais os ácidos graxos podem afetar o sistema imune dos animais e a resistência a doenças. Primeiramente, pela influência na composição da membrana celular, uma vez que os ácidos graxos da dieta determinam a composição dos fosfolipídios, com significativo efeito sobre a resistência a doenças, uma vez que a resposta imune depende da interação com a membrana de leucócitos. O segundo, envolve alterações no sistema de transdução, possivelmente em função dos efeitos sobre a proteína quinase C e, o terceiro, pelo efeito na produção de eicosanóides imunologicamente ativos (proporção de ácido eicosapentanóico, 20:5n-3 – EPA; ácido docohexanóico, 22:6n-3 – DHA; e o ácido araquidônico, 20:3n-6 - AA). Entretanto, os autores ressaltaram a necessidade e a importância de novas pesquisas nessa área.

Blazer et al. (1989) encontraram diferenças em bagres do canal arraçoados com rações comerciais e confeccionadas em laboratório. Destacaram que as diferenças entre as rações, que provavelmente contribuem para as respostas distintas, são o conteúdo de lipídeos e a razão entre os ácidos graxos linolênico e linoléico. Os autores também sugerem que o nível e/ou a composição dos lipídeos da dieta possuem importante ação na resistência às doenças.

Os microingredientes estão intimamente ligados a inúmeros processos no organismo, dos quais, o sistema imune também participa. Tanto as vitaminas como os minerais desempenham importante papel na manutenção e/ou estimulação do sistema imune.

A vitamina C possui capacidade de influenciar positivamente o sistema imune e mitigar os efeitos do estresse quando administrada em doses maiores do que aquelas recomendadas para evitar sinais de deficiência. Contudo, são encontrados na literatura relatos de que o uso de megadoses dessa vitamina na dieta de algumas espécies de peixes não surtiu efeito na produção de anticorpos e na resistência a doenças (Gatlin, 2002).

O efeito das vitaminas antioxidantes sobre o sistema imune é observado nas células que realizam fagocitose, sendo que durante este processo peróxidos e radicais livres são



produzidos para destruir os patógenos fagocitados. Em algumas ocasiões, este processo pode acarretar superprodução desses compostos, tornando-se letal para a própria célula. Dessa maneira, os antioxidantes diminuem a produção de peróxidos provenientes da oxidação de lipídeos e de radicais livres de oxigênio (Lall e Olivier, 1993).

Dentre os minerais, o ferro é importante componente de metaloenzimas que produzem radicais livres de oxigênio em células fagocitárias. Estes radicais somados à produção de peróxidos são responsáveis pela destruição dos patógenos depois da fagocitose, por meio do estresse oxidativo (Pezzato et al., 2004). O zinco é outro mineral que compõem as metaloenzimas que atuam no metabolismo dos ácidos nucleicos e na síntese protéica, sendo fundamental para a síntese dos hormônios produzidos pelo timo, os quais estimulam a atividade do linfócito T no organismo (Beisel, 1996). Assim como o selênio, também possui funções no sistema imunológico, tais como antioxidante, formação de anticorpos, produção de eicosanoides, estresse oxidativo dos fagócitos e toxicidade das células exterminadoras naturais (Spallholtz et al., 1990; Lovell, 1998).

Outra importante área envolvendo a nutrição e a saúde de peixes, que vem sendo aprofundada nas pesquisas, é o uso de imunostimulantes com intuito de aumentar e/ou estimular os mecanismos de resposta imune não específica. A eficiência dos diferentes imunostimulantes em peixes é influenciada pela forma de administração, dosagem, período de utilização e o tipo, espécie e patógeno (Sakai, 1999). Desta maneira, deve-se destacar a importância do adequado balanceamento de nutrientes na dieta não apenas para o máximo desempenho produtivo, mas também o adequado funcionamento do sistema imunológico.

A análise das proteínas plasmáticas é também considerada forma de avaliação da condição de saúde dos animais por esta ter como função regular a resposta inflamatória e prover resistência à infecção. As proteínas do plasma em peixes variam em relação às diferentes espécies. Este autor destaca que, em casos de estresse e inflamação, ocorre aumento na produção de globulinas que migram nas frações  $\alpha$  e  $\beta$ , como parte da resposta aguda (Thomas, 2000).

Todos os peixes apresentam a ausência ou quase ausência de certas globulinas, especialmente as consideradas mais importantes para os animais superiores. As frações incluem albuminas e globulinas (alfa, alfa<sub>2</sub>, beta e gama). A maioria das imunoglobulinas de animais superiores estão presentes nas globulinas gama e beta. A quase ausência de gamaglobulina no soro de peixes, talvez explique porque os peixes não são tão imunocompetentes quanto os animais superiores (Belem-Costa, 2001).

Estudos indicam que as imunoglobulinas de peixes são macroglobulinas e têm pouca

ou quase nenhuma fração de imunoglobulina similar a IgG dos animais superiores. A IgG é o mais importante antiviral, antibacteriano e antitoxina de animais superiores, equivalendo a quase 80,0% de todas as imunoglobulinas. Em peixes, a principal classe de imunoglobulinas com funções antibacteriana e antiviral é semelhante a IgM dos animais superiores (Shelton e Smith, 1970). A atividade das imunoglobulinas foi demonstrada em peixes ovíparos e em peixes vivíparos com gestação ovariana e com gestação folicular, segundo Scapigliati et al. (1999). Outras substâncias envolvidas na resposta imune ou na resistência natural são a transferrina, lisozima, interferon e complemento.

A avaliação de parâmetros imunes pode ser importante ferramenta para o entendimento das respostas fisiológicas, por ser sensível à ação de fatores estressores. Segundo Watts et al. (2001), para se adotar este fator como indicador da higidez dos peixes é de fundamental importância o entendimento da complexidade deste sistema, suas peculiaridades e a influência sofrida tanto do animal quanto do meio sobre algumas de suas variáveis, para que não hajam interpretações equivocadas.

Com a intensificação na produção de peixes e conseqüente aumento da suscetibilidade a invasão de patógenos, a necessidade de se introduzir novas estratégias de manutenção do bem-estar animal e a prevenção a doenças, tornou o uso de imunoestimulantes linha de pesquisa promissora, a qual é reconhecida pelo estímulo da imunidade não específica e específica. Dessa maneira, todos os conhecimentos adquiridos sobre imunidade em peixes tendem a contribuir com esta estratégia.

### 3. *IMUNOESTIMULANTE*

Há alguns anos identificou-se que algumas substâncias biológicas podiam influenciar e aumentar o mecanismo não específico de defesa nos animais. Estas substâncias foram agrupadas sob o nome de imunoestimulantes, as quais podem ser produzidas por fontes naturais ou sintéticas. Dessa maneira conceitua-se imunoestimulante como a substância que aumenta a atividade do sistema imune por meio da interação direta entre as células do sistema. As principais respostas são o aumento da atividade do macrófago, fagocitose por neutrófilo e monócito, maior produção de linfócitos, imunoglobulinas e lisozima (Raa, 1996; Sakai, 1999).

A indústria aquícola, com o passar dos anos, vem aumentando o interesse sobre o uso de imunoestimulantes, tanto como adjuvantes para vacinas quanto para mitigar os efeitos secundários causados pelo estresse inerente à condição intensiva de produção. Segundo Burrells et al. (2001), o aumento da susceptibilidade dos peixes à doenças é decorrente da imunossupressão causada por estresse associado à intensificação dos sistemas de produção, representado principalmente pelo manejo adotado e por fatores ambientais desfavoráveis. Por conseguinte, as perdas nestes sistemas são consideráveis e a alternativa de poder reduzi-las parece ser de grande valia, principalmente com a utilização de imunoestimulantes como medida profilática (Selvaraj et al., 2005).

A maioria dos imunoestimulantes é composta por componentes químicos existentes na composição estrutural de bactérias, colônias de fungos e leveduras. Entretanto, existem compostos sintéticos, originalmente fabricados para outros propósitos que, acidentalmente, descobriu-se atividade imunoestimulante. Diversos grupos de substâncias determinam efeitos imunoestimulantes em animais terrestres, mas apenas algumas se mostraram eficazes para peixes (Raa et al., 1992; Volpatti et al., 1998). Dentre estas, destacam-se aquelas naturais, como a parede celular de leveduras, que incluem principalmente glucanos e mananoglicosacarídeos (Engstad e Robertsen, 1993).

O  $\beta$ -glucano é encontrado em todos os cereais, mas as concentrações são maiores em aveia e cevada, com valores na faixa de 2,0 a 6,0% (Genç et al., 2001). Esses polissacarídeos ocorrem em grande quantidade no endosperma e na parede celular, apresentando ligações  $\beta$  1-3 e  $\beta$  1-4 glucano (Carr et. al., 1990). Os cogumelos comestíveis também apresentam compostos que têm propriedades funcionais, em particular os homo e hetero-glucanos com ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  1-3 e  $\beta$  1-6 (Manzi e Pizzoferrato, 2000). No entanto, além das

propriedades farmacológicas encontradas nos polissacarídeos de origem vegetal, os polissacarídeos de origem fúngica apresentam outras propriedades tais como: atividades antitumoral, imunomodulatória, antiviral, antimicrobiana e antiparasitária (Wasser e Weis, 1999).

Conforme destacado, a maioria dos imunostimulantes em rações para peixes são polissacarídeos derivados de bactérias, fungos ou leveduras e plantas. Essas substâncias são retiradas das próprias células ou preparadas a partir de paredes celulares contendo moléculas de 1,3 e 1,6  $\beta$ -glucano que estimulam a resposta imune não-específica (Gannam e Schrock, 2001).

A parede celular da levedura é espessa e pode representar de 15,0 a 30,0% da matéria seca total (Rose, 1993; Hough, 1990). São constituídas por cerca de 40,0% de  $\beta$ -glucanos, 40,0% de  $\alpha$ -mananos, 8,0% de proteínas, 7,0% de lipídios, 3,0% de substâncias inorgânicas e 2,0% de hexosaminas e quitina (Hough, 1990). Segundo Rose (1993), de 60,0 a 90,0% da parede celular é composta por polissacarídeos, sendo a maior parte composta por glucanos e fosfomananos.

Os  $\beta$ -glucanos são os principais polissacarídeos encontrados na parede celular de leveduras, fungos filamentosos e cogumelos, onde evolutivamente representam um dos mais antigos microbicidas. Consequentemente, vertebrados superiores desenvolveram diversos mecanismos de reconhecimento desses polissacarídeos durante a evolução. Provavelmente, por essa razão estudos demonstraram a capacidade do  $\beta$ -glucano em estimular ou ativar o sistema imune não específico de vertebrados superiores, plantas, invertebrados e vertebrados.

A utilização destes polissacarídeos como ingredientes melhoradores da saúde de peixes foi destacada por Nikl et al. (1991), Anderson (1992), Robertsen et al. (1994) e Sakai (1999). Estes autores relataram que a utilização de glucanos para peixes melhorou a atividade do sistema imune não específico e aumentou a resistência contra certos patógenos.

Robertsen et al. (1994) enfatizaram a utilização de  $\beta$ -glucano proveniente da parede celular da levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, na aquicultura, por ser produzido na natureza, não deixar resíduo no produto industrializado e por não prejudicar a qualidade da água de cultivo. Segundo Gannam e Schrock (2001), a estrutura do glucano é muito importante para sua atividade, sendo que  $\beta$ -glucanos com poucas cadeias laterais possuem atividade limitada. De acordo com Dugger e Jory (1999), as moléculas lineares como 1,6  $\beta$ -glucano são ativas apenas no final da cadeia, possuindo assim baixa probabilidade de encontrar seu receptor nos hemócitos do camarão marinho, *Penaeus monodon*. De forma oposta, por possuir três

ramificações do tipo hélice, a molécula 1,3  $\beta$ -glucano tem alta probabilidade de encontrar o seu receptor. Qualquer rotação que a molécula adquira, sempre localizará o receptor.

Assim, a utilização de extratos de  $\beta$ -glucano com estrutura composta por cadeia principal com unidades de glicose possuindo ligação  $\beta$  1-6 e cadeias laterais com ligações  $\beta$  1-3 estimula os mecanismos de defesa não específico dos animais, incluindo os peixes (Robertsen et al., 1990; Figueras et al., 1998). A extração e a purificação desses extratos são procedimentos que demandam cuidados, podendo proporcionar maior ou menor grau de eficiência do produto. A dificuldade consiste na retirada da manano proteína que envolve a célula de levedura e que está ligada covalentemente com o 1,3/1,6  $\beta$ -glucano (atividade biológica de interesse) sem danificá-lo.

Os imunostimulantes agem sob diversas maneiras, sendo sua forma de atuação não muito clara. Vários fatores afetam a eficácia dos mesmos, sendo a forma de administração, o principal deles. A forma injetável é mais eficaz do que a administrada via dieta, tornando-se necessários estudos que objetivem aumentar a eficiência e viabilizar a utilização nesta forma (Gannam e Schrock, 2001). Sahoo e Mukherjee (2002), avaliando o efeito de dietas contendo diferentes tipos de imunomoduladores em carpa indiana, *Labeo rohita*, sobre a infecção com *Edwardsiella tarda*, sugeriram que a inclusão desses imunomoduladores, especialmente o 1,3  $\beta$ -glucano nas dietas para peixes sob condições de imunossupressão ou estresse, podem aumentar a resistência contra infecções e reduzir a porcentagem de mortalidade. Corroborando, o uso de imunostimulantes nas dietas aumentou a resistência a doenças em dourada, linguado, *Paralichthys olivaces*, e carpa (Couso et al., 2003; Kwak et al., 2003).

Miles et al. (2001) avaliaram cinco imunostimulantes em dietas para “striped snakehead”, *Channa striata*, entre eles o produto comercial *Betamak 85*<sup>®</sup> (glucanos e mananos). Para os parâmetros avaliados (desafio com bactérias, histologia das fibras musculares e concentração de anticorpos) o produto não demonstrou melhora em relação aos demais; no entanto, estes autores enfatizaram que estes polissacarídeos são promissores imunostimulantes em dietas para peixes. Igualmente, Burrels et al. (2001) em pesquisa com salmonídeos, suplementaram 0,2% de  $\beta$ -glucanos na dieta e concluíram que este nível, apesar de não significativo, determinou menor mortalidade contra infecção com *Vibrio anguillarum*, quando comparado à dieta controle.

Inicialmente, acreditava-se que o mecanismo de ação do  $\beta$ -glucano era por meio da estimulação da hematopoiese. Em estudos recentes observaram-se evidências de receptores específicos para  $\beta$ -glucano em macrófagos (Jorgensen e Robertsen, 1995). A literatura

apresenta evidências da existência de receptores para  $\beta$ -glucano em macrófagos de salmão do Atlântico, no qual, sustenta a regra que os glucanos induzem a defesa anti-bacteriana em peixes (Engstad e Robertsen, 1993). A proteína receptora da membrana em macrófagos para 1,3  $\beta$ -glucano também foi descoberta na hemolinfa de crustáceos (Cerenius et al., 1994). Segundo Secombes e Fletcher (1992), os macrófagos são parte integral da resposta imune não específica, reconhecendo e processando os antígenos, e ativando os linfócitos. Segundo Raa et al. (1992), a suplementação com  $\beta$ -glucano em peixes induz a ativação dos macrófagos, que promovem a liberação de interleucina do tipo I, a qual estimula a multiplicação de linfócitos T e a produção de interferon, desencadeando dessa maneira a defesa imune não específica.

O aumento da resposta dos anticorpos em trutas arco-íris alimentadas com  $\beta$ -glucano, devido à ativação/modulação do sistema complemento pelo  $\beta$ -glucano também foi observado por Verlhac et al. (1998). A ativação do sistema complemento em peixes pode causar destruição do microorganismo invasor por meio de lise osmótica (Landolt, 1989).

Chen e Ainsworth (1992) determinaram elevado nível de anticorpos contra *Edwardsiella ictaluri* no plasma de bagre do canal que receberam injeção de  $\beta$ -glucano derivado da levedura, em relação ao tratamento controle. O objetivo da imunoestimulação em peixes não é apenas promover maior eficiência da resposta imune para infecções contra agentes patogênicos, mas também reduzir o efeito imunossupressivo do estresse (Anderson, 1992).

As flutuações da temperatura da água afetam predominantemente os peixes cultivados em relação aos peixes que habitam livremente os rios e oceanos, uma vez que os mesmos não podem mover-se livremente na água do tanque, a fim de procurar a termoregulação em águas com temperatura próxima ao conforto térmico (Watts et al., 2001). Segundo Hardie et al. (1994), baixas temperaturas causam supressão na produção de importantes fatores relacionados ao macrófago (reativos do oxigênio e nitrogênio). Em temperaturas abaixo do conforto térmico para a espécie, o sistema imune não específico possui maior relevância no mecanismo de defesa. Dessa maneira, a suplementação de imunoestimulante pode compensar a supressão, ativando diretamente os macrófagos (Raa, 1996).

Tanto o estresse físico como o social também são capazes de promover alterações imunológicas nos peixes. Glicocorticóides são liberados em respostas a situações de estresse, os quais aumentam a susceptibilidade dos peixes a doenças por suprimir as funções dos linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Pickering et al., 1982).

A alimentação com  $\beta$ -glucanos estimula a imunidade não específica, auxiliando a

profilaxia em peixes, sendo esta mensurada por meio do aumento da atividade fagocítica, número de leucócitos e relação albumina-globulina (A:G). A relação A:G é componente de defesa não específica, podendo assim, ser mensurada. O aumento da porcentagem de albumina e globulina foi observado em carpas indianas alimentadas com dietas contendo  $\beta$ -glucano (Misra et al., 2006). Segundo Sahoo e Mukherjee (2001), a redução da relação A:G em peixes alimentados com  $\beta$ -glucano pode ser decorrente do aumento de globulinas no soro, efeito esse, importante para o mecanismo de defesa. Por outro lado, Bagni et al. (2000) não observaram alteração na relação albumina-globulina em robalos, *Dicentrarchus labrax*, alimentados com rações suplementadas com dietas contendo  $\beta$ -glucano.

Segundo Assem e El-Zaeem (2005), a condição de saúde e resistência dos peixes a doenças pode ser mensurada indiretamente por parâmetros imunológicos observados em amostras de sangue. Um desses parâmetros pode ser a atividade do anticorpo (IgM), segundo Fjalested et al. (1993). A quantidade de IgM e a concentração de proteína plasmática presente no sangue podem indicar a condição imune do peixe, uma vez que a IgM é responsável em parte pela resposta imune frente à invasão bacteriana (Magnadottir e Guomundsdottir, 1992). Em algumas espécies de peixes como o salmão do Atlântico, alabotes do Atlântico, *Hippoglossus hippoglossus*, arinca, *Melanogrammus aeglefinus*, e o bacalhau do Atlântico, a IgM pode corresponder a 2,0; 8,0; 13,0 e 20,0% da proteína plasmática, respectivamente (Magnadottir, 1998).

A distribuição de 1,3  $\beta$ -glucano marcado radioativamente sugeriu, segundo Ingebrigtsen et al. (1993), que a administração regular de  $\beta$ -glucano mantém a presença do mesmo nos tecidos, permitindo assim, maior período de administração do imunoestimulante em dietas para peixes. Por outro lado, segundo Matsuo e Miyazano (1993), o efeito da administração de glucanos nas dietas por longos períodos de tempo não foi esclarecido ainda, necessitando maior estudo. Desta maneira, esses mesmos autores demonstraram que trutas arco-íris alimentadas com peptidoglicano por 56 dias não demonstraram proteção quando desafiadas com *Vibrio anguillarum*, enquanto que as alimentadas por 28 dias e desafiadas da mesma forma apresentaram maior proteção.

O uso profilático de 1,3  $\beta$ -glucano para bagre do canal foi proposto por Chen e Ainsworth (1992). Santarém et al. (1997) demonstraram que para “turbot”, *Scophthalmus maximus* L., a inclusão de  $\beta$ -glucano aumentou a atividade respiratória dos leucócitos e a atividade da lisozima, quando comparados com o controle.

A secreção de componentes do sistema complemento e a atividade da lisozima estão

associadas ao aumento de fagocitose em mamíferos. Tal fato foi também demonstrado para o “yellowtail”, *Seriola quinqueradiata*, depois da estimulação com 1,3  $\beta$ -glucano (Matsuyama et al., 1992). A intensidade da atividade da lisozima é influenciada inter e intraespécie, conforme demonstrada em diversos estudos para peixes (Fletcher e White, 1973; Grinde et al., 1988; Lie et al., 1989). Diferença nos métodos analíticos utilizados e a genética também contribuem para variabilidade desse parâmetro. Assim, segundo Bagni et al. (2000), mesmo que a atividade da lisozima aumente e sofra variação quando da utilização de imunestimulante na dieta, este parâmetro pode ser considerado imunocompetente.

Em peixes a fagocitose é reconhecida como importante elemento de defesa contra microorganismos (Oliver et al., 1986), sendo que a inclusão de glucano na dieta eleva a atividade fagocítica, bem como a frequência respiratória das células, independentemente da dose de glucano administrada.

Secombes e Fletcher (1992) afirmaram que a frequência respiratória é o principal mecanismo bactericida de fagócitos em peixes. Jeney et al. (1997) demonstraram que a atividade respiratória dos leucócitos foi detectada pela redução de ferrocitocromo C, no grupo controle e no tratamento com maior nível de inclusão de  $\beta$ -glucano (1,0%) esta atividade foi inibida, o que não ocorreu em níveis intermediários.

A literatura evidencia também que o sistema complemento, por meio de sua via alternativa, é bom indicador da resistência a doenças em peixes (Li e Lovell, 1985; Rotllant et al., 1997); porém, poucos estudos descrevem o efeito da suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta de peixes sobre a atividade desse sistema. Bagni et al. (2000) observaram aumento significativo da atividade do complemento no plasma de robalo, arraçoados com dietas suplementadas com imunestimulantes; porém, não conseguiram determinar o efeito específico de cada imunestimulante. Por outro lado, Baulny et al. (1996) demonstraram em “turbot”, que a utilização por longo período de  $\beta$ -glucano na dieta não influenciou a atividade do complemento no plasma.

Sung e Hsieh (1994) com a finalidade de testar a ação do 1,3  $\beta$ -glucano em pós-larvas de camarões marinhos por meio de imersão, observaram que a concentração maior que 0,5 ppt foi significativa para a proteção sobre os agentes patógenos. Modificações nos tecidos foram observadas nos camarões marinhos, características similares a efeitos tóxicos. Entretanto, segundo estes mesmos autores, a toxicidade pelo  $\beta$ -glucano não foi ainda reportada. A inclusão de altas doses de  $\beta$ -glucano em dietas para peixes pode causar reação de hipersensibilidade. Poucos estudos foram feitos para demonstrar tal fato, mas segundo Jeney



et al. (1997) isto pode acontecer.

Segundo Dugger e Jory (1999), em hemócitos de camarão, *Penaeus monodon*, o 1,3  $\beta$ -glucano possui a habilidade de ativar e sintetizar vários mecanismos podendo agir como antibiótico natural, antifúngico e antiviral, estimulando a produção de hemócitos, aumentando a capacidade de cicatrização, coagulação e principalmente como mais um fator para amenizar os efeitos causados pelo estresse. Chang et al. (2003) utilizando à mesma espécie de camarão, demonstraram que a suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta na concentração de 10g/kg durante 20 dias aumentou significativamente a sobrevivência quando do desafio com o vírus da síndrome da mancha branca, “White Spot Syndrome Vírus”-WSSV.

Sung e Hsieh (1994), em experimento realizado com camarões marinhos, *Penaeus monodon*, encontraram alta porcentagem de sobrevivência dos mesmos contra *Vibrio vulnificus* durante os 18 dias de desafio, quando alimentados com 1,3  $\beta$ -glucano em relação a dieta controle, ausente da suplementação do 1,3  $\beta$ -glucano. Alta porcentagem de sobrevivência em camarões marinhos também foi descrita (Dugger e Jory, 1999) após uma única imersão em solução contendo 1,3  $\beta$ -glucano, quando desafiados com bactérias. A mortalidade teve início após 60 dias do tratamento.

Sahoo e Mukherjee (2001) em pesquisa com a carpa indiana determinaram efeito significativo para proteção contra *Aeromonas hydrophila* quando alimentadas por sete dias com dietas suplementadas com 0,1% de  $\beta$ -glucano em comparação ao controle sem suplementação. Segundo Robertsen et al. (1994), o aumento da resistência contra bactérias patogênicas em peixes alimentados com  $\beta$ -glucanos é explicado, em parte, pelo aumento da atividade fagocítica dos macrófagos.

Raa et al. (1992) conduzindo experimento com salmão do Atlântico, observaram que a administração oral de  $\beta$ -glucano promoveu aumento da proteção contra *V. anguillarum* e *V. salmonicida*. Baulny et al. (1996) também determinaram efeito significativo contra estes mesmos patógenos em “turbot”.

O uso de injeção intraperitoneal de  $\beta$ -glucano mostrou efeito significativo no sistema imune não-específico em peixes desafiados com *V. anguillarum* comparados com *V. salmonicida* ou *Yersinia ruckeri*.  $\beta$ -glucano injetado em altas doses (100,0 mg/kg de peixe) não promoveu proteção na primeira semana, mas apenas nas últimas três semanas. Baixas doses (2,0 a 10,0 mg/kg de peixe) promoveram máxima proteção já na primeira semana, declinando no decorrer das semanas subsequentes (Robertsen et al., 1990).

Figueras et al. (1998) testando a inter-relação e a influência da seqüência de

administração de  $\beta$ -glucano e vacina para *Vibrio damsela* na resposta imune para o “turbot”, observaram aumento significativo da resposta imune não-específica contra a bactéria quando o peixe recebeu  $\beta$ -glucano ao mesmo tempo que sofreu a vacinação ou após a mesma, comparado com a administração antes da vacinação. Moyner et al. (1993) observaram em salmão do Atlântico infectado com *A. salmonicida* o aumento da atividade da lisozima quatro dias após a administração de  $\beta$ -glucano, alcançando o pico de sua atividade nove dias após a administração.

Segundo Dugger e Jory (1999), acredita-se que para camarões marinhos a administração de 1,3  $\beta$ -glucano duas vezes por semana seja suficiente para manter ótima ativação das células do sistema imune não-específico. Esses autores recomendaram estudos para determinar a dose necessária e o tempo de administração do produto. Gannam e Schrock (2001) também sugeriram a necessidade de determinação do melhor nível de suplementação de  $\beta$ -glucano em dietas para peixes e o período de administração deste imunoestimulante.

Neste sentido, Misra et al. (2006) avaliaram o efeito da administração de  $\beta$ -glucano por 56 dias, nas concentrações de 0,0; 100,0; 250,0; e 500,0 mg/kg da dieta em juvenis de carpa indiana, para posteriormente serem desafiados com *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda*. Observaram que os parâmetros imunológicos como a atividade do macrófago, lisozima e sistema complemento aumentaram atingindo pico aos 42 dias de alimentação, sendo o nível de 250,0 mg/kg o que promoveu melhor resposta e o recomendado pelos autores para melhora do sistema imunológico, crescimento e sobrevivência.

O efeito da suplementação de  $\beta$ -glucano em dietas para peixes também pode influenciar o ganho de peso. Segundo Lopez et al. (2003), o  $\beta$ -glucano é degradado no trato digestório por glucanases para a produção de energia, permitindo assim, o uso eficiente de proteínas para o crescimento muscular. Corroborando, Misra et al. (2006) observaram efeito significativo da suplementação de  $\beta$ -glucano em relação à dieta controle (ausente de suplementação), independentemente do nível suplementado no ganho de peso para carpa indiana. Igualmente, o aumento no ganho de peso e a melhora na eficiência alimentar em peixes também foram relatadas (Cook et al., 2003; Jaramillo e Gatlin 2004). Entretanto, por serem contraditórias as informações sobre o uso de  $\beta$ -glucano em peixes por períodos prolongados, questões como o uso de imunoestimulante visando o aumento do ganho de peso permanecem em aberto, em função do risco de imunossupressão com aumento da susceptibilidade a doenças (Misra et al., 2006).

A nutrição e o uso de imunoestimulantes possuem efeito sinérgico, promovendo

redução dos efeitos do estresse na aquicultura. A vitamina C não é considerada estritamente um imunestimulante, porém fornece substratos e participa como cofator necessário para o bom funcionamento do sistema imune antes e durante situações de estresse. O efeito do estresse no sistema imune de peixes tem sido amplamente estudado, segundo Barton e Iwama (1991), tendo este complexo mecanismo de atuação no sistema imune.

O principal modo de ação sobre a diminuição da resistência a doenças nos peixes está relacionado ao número de linfócitos, atividade dos macrófagos e sobre a produção de anticorpos (Pickering, 1987). Desta maneira, Verlhac et al. (1996), avaliando a combinação entre glucanos e doses de vitamina C (150,0; 1000,0 e 4000,0 mg/kg da dieta) em dietas para truta arco-íris, concluíram que estes microingredientes se apresentaram como imunestimulantes, melhorando alguns parâmetros imunológicos específicos e não específicos. Estes autores ressaltaram a importância da utilização destes microingredientes como método profilático em dietas para trutas. Verlhac et al. (1998) avaliando igualmente a combinação entre  $\beta$ -glucano e vitamina C (150,0 e 1000,0 mg/kg da dieta) em dietas para truta arco-íris, observaram efeito significativo da interação para o aumento dos mecanismos de defesa específico e não específico.

O efeito sinérgico da utilização de  $\beta$ -glucano, vitamina C e  $\alpha$ -tocoferol por longo período (40 semanas) em dietas foi observado no sistema imunológico do robalo. Determinou-se aumento significativo da atividade do sistema complemento e da lisozima nos peixes que receberam dieta contendo 2,0% de  $\beta$ -glucano e 500,0 ppm de vitamina C e  $\alpha$ -tocoferol em comparação ao tratamento controle (100,0 ppm de vitamina C e 200,0 ppm  $\alpha$ -tocoferol) (Bagni et al., 2000).

Lopez et al. (2003), avaliando o efeito da suplementação de diferentes níveis de  $\beta$ -glucano e vitamina C para o camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, em resposta ao estresse, observaram aumento da resistência, ressaltando que tanto o  $\beta$ -glucano quanto a vitamina C agem por meio de diferentes vias em resposta ao estresse. A administração contínua de  $\beta$ -glucano por longo período (40 dias) promoveu fadiga no sistema imune, como resultado do estado de alerta intermitente (Chang et al., 2000). Em contraste, a vitamina C administrada constantemente não se mostrou prejudicial para o camarão marinho. Desta maneira, os autores afirmaram que a administração de dietas contendo  $\beta$ -glucano e vitamina C devem ser administradas por períodos reduzidos.

Castro et al. (2006) relataram efeito sinérgico *in vitro* da suplementação de  $\beta$ -glucano e o polissacarídeo extraído de algas marinhas, *Ulva rígida*, sobre a atividade respiratória de

leucócitos. Inferiram os autores que a resposta induzida pelo  $\beta$ -glucano é alta e rápida, podendo levar a exaustão do sistema imune em concentrações elevadas e a, do extrato, é em menor intensidade e dura mais tempo, quando ambos imunoestimulantes foram testados separadamente. Entretanto, quando administrados juntos o efeito foi intenso e prolongado, sugerindo que a atividade respiratória se deu por diferentes vias.

#### 4. VITAMINA C

Algumas espécies animais, dentre essas a maioria dos peixes, não sintetizam o ácido ascórbico, vitamina C, em função da ausência da enzima L-gulonolactona oxidase para sua síntese à partir da glucose (Lehninger et al., 1995; Dabrowski e Moreau, 1996). Em função dessa característica essa vitamina deve ser fornecida via ração em quantidades adequadas para suprir as necessidades metabólicas da espécie.

A vitamina C na sua forma natural, ácido ascórbico, é facilmente oxidada passando para a forma do ácido dehidroascórbico. Este composto por sua vez não possui grande afinidade para ser absorvido, podendo ser excretado e/ou oxidado, perdendo sua atividade (Buddington et al., 1993).

Visando melhorar a estabilidade da vitamina C, esta pode ser química ou biologicamente alterada, podendo ser associada a outros elementos como, por exemplo, o fosfato, sulfato, sódio, magnésio, gorduras e etilcelulose, proporcionando proteção ao ácido ascórbico cristalino no interior da vitamina (Li e Robinson, 2001). Assim, diferentes formas de ácido ascórbico protegido foram desenvolvidas, sendo a mais utilizada o ácido ascórbico polifosfatado (APP), originário da combinação dos grupamentos fosfatos com a cadeia carbônica da vitamina (Tolbert et al., 1975).

Diversas funções dessa vitamina hidrossolúvel podem ser destacadas, dentre as quais: forte agente redutor em diversas reações metabólicas; age poupando as vitaminas lipossolúveis A, E e algumas do complexo B, protegendo-as da oxidação; é necessária para a formação do colágeno, sendo que nos tecidos conectivos como ossos, cartilagens, dentina e dermes, exerce importância na formação da matriz orgânica e, portanto, na manutenção do tecido conjuntivo e processo de cicatrização. Segundo Barros et al. (2006), a vitamina C é fundamental para a manutenção da integridade de vasos sanguíneos, no processo de cicatrização e na formação dos arcos branquiais.

Outras funções também estão descritas na literatura para a vitamina C. Lovell (1998) ressaltou a importância dessa vitamina na conversão do ácido fólico para ácido folínico e sua atuação no metabolismo da tirosina. Esta vitamina promove também a síntese de carnitina a partir da lisina e da metionina (Miyasaki et al., 1995). Panush e Delafuente (1985) enfatizaram que a vitamina C possui habilidade de minimizar a quantidade de radicais livres decorrentes da respiração celular, evitando em parte a desestabilização da membrana lipídica, importante para o funcionamento do sistema imune. Estudos também demonstraram que o ácido ascórbico influencia na absorção, metabolismo e excreção de vários elementos minerais,

dentre os quais se destaca o ferro (Halver, 1985). A vitamina C atua como agente redutor transformando o íon ferro do estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para a forma absorvível, ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), liberando-o da proteína transportadora transferrina e da armazenadora, ferritina.

Os principais tecidos que armazenam ácido ascórbico nos peixes são: fígado, sangue, rim e pele (Halver, 1972). Segundo Hilton et al. (1978), a concentração dessa vitamina é influenciada diretamente pela concentração na dieta.

A exigência de vitamina C varia entre as espécies e também dentro da própria espécie. A linhagem, o tamanho e a idade também podem afetar a exigência. Pode-se acrescentar, ainda, o sistema de criação adotado. A literatura apresenta valores de exigência para várias espécies, que foram determinados objetivando o máximo desempenho produtivo e o aparecimento de sinais clínicos de deficiência (Li e Robinson, 2001). Para a espécie em estudo, a tilápia do Nilo, Soliman et al. (1994) determinaram que a mesma necessita de 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta para proporcionar o máximo desempenho.

Diversos sinais clínicos, consequência da ausência ou insuficiência de suplementação do ácido ascórbico, estão descritos na literatura, em função da ampla participação metabólica dessa vitamina. Pode-se relatar lordose, escoliose, hemorragias, perda do apetite, exoftalmia, redução na porcentagem de hematócrito, redução na concentração de colágeno nos ossos, perda de escamas, deformidades operculares e de brânquias, cicatrização deficiente, prejuízo no metabolismo do ferro e anemia microcítica hipocrômica em diversas espécies de peixes (Halver et al., 1969; Wilson e Poe, 1973; Lim e Lovell, 1978; Agrawal e Mahajan, 1980; Shiau e Jan, 1992; Abdelghany, 1996; Hilton et al., 1978; Lim et al., 2000; Barros et al., 2002).

Com a intensificação na produção e o constante estresse que os peixes são expostos, deve-se ressaltar a importância de se estudar quais as reais necessidades nutricionais para o enfrentamento desta condição inevitável de estresse. Modificações consideradas discretas na formulação das dietas podem não causar sinais visíveis de alterações; porém, podem influenciar a resistência a doenças e colocar os peixes em condição de deficiência marginal uma vez que, estes se apresentam aparentemente saudáveis; porém, se desafiados, podem não resistir. Essa condição de limite é considerada a mais arriscada para o sucesso da produção. Frequentemente, é difícil diagnosticar a causa de deficiências nutricionais, porque a exigência quantitativa dos nutrientes foi determinada, especificamente, para crescimento (Barros et al., 2006).

Corroborando, a capacidade dessa vitamina de melhorar a condição de saúde do peixe, influenciando o sistema imune e a resistência a doenças, quando suplementada em níveis

acima da exigência para o máximo desempenho produtivo vem sendo amplamente reconhecida (Gatlin, 2002). Concentrações de vitamina C maiores do que as necessárias para proporcionar desempenho normal em bagre do canal, vêm sendo recomendadas para prevenção de infecções bacterianas (Durve e Lovell, 1982; Li e Lovell, 1985).

Kitabchi (1967) descreveu que altos níveis de ácido ascórbico têm efeito inibitório na síntese de esteróides pela prevenção da conversão de ácidos graxos insaturados em ésteres de colesterol, os quais são incorporados nos hormônios esteróides. O autor também inferiu que o aumento da reserva de ácido ascórbico no peixe, preveniria a severidade da resposta ao estresse. Estudos indicam também que a suplementação dessa vitamina em altos níveis pode ter efeito benéfico não só na prevenção de doenças em peixes saudáveis, como também no aumento da resistência a infecções em peixes já imunocomprometidos (Pezzato et al., 2004).

Entretanto, resultados de pesquisas sobre o efeito da vitamina C em promover melhor resistência a doenças ainda são contraditórios em peixes. Nesse sentido, Navarre e Halver (1989) observaram aumento da resistência contra *Vibrio anguillarum* em trutas arco-íris alimentadas com dietas suplementadas com vitamina C (500; 1000 e 2000 mg/kg da dieta) em relação ao tratamento ausente de suplementação; porém, não houve diferença significativa entre os níveis suplementados. Resultado semelhante foi encontrado para salmão do Atlântico desafiado com *Aeromonas salmonicida* (Hardie et al., 1991; Waagbo et al., 1993). De forma oposta, estudos demonstraram que não há efeito significativo da suplementação com altas doses de vitamina C na melhora da resistência do salmão do Atlântico infectado com *Aeromonas salmonicida* ou *Vibrio anguillarum* (Erdal et al., 1991).

Liu et al. (1989) testando o efeito de megadoses de vitamina C sobre a resposta imunológica em bagre do canal, não observaram efeito significativo sobre a atividade do complemento e anticorpos. Porém, peixes que receberam 1000 mg de vitamina C/kg da dieta demonstraram resistência contra *Edwardsiella ictaluri*.

Segundo Eichbaum et al. (1977) e Navarre e Halver (1989), peixes com alta concentração de ácido ascórbico nos tecidos apresentam melhor tolerância à poluição ambiental e melhor resistência a infecções por bactérias. Li e Lovell (1985) enfatizaram que dietas contendo megadoses de ácido ascórbico (3000 mg de vitamina C/kg da dieta) não aumentaram a atividade fagocítica, mas proporcionaram aumento significativo da produção de anticorpos e da atividade do sistema complemento dos peixes. Corroborando, Waagbo et al. (1993) ressaltaram que a suplementação de mega dose de vitamina C em salmão do Atlântico interferiu na fase de controle inicial da produção de anticorpos pela estimulação de linfócitos e aumento da resposta da via alternativa do sistema complemento.

Roberts et al. (1995) demonstraram que o linguado alimentado com dietas contendo níveis de 300; 1000 ou 2000 mg de ascorbato-cálcio/kg da dieta tem a capacidade fagocitária das células dos rins e fígado positivamente correlacionadas com a concentração de vitamina C. Determinaram, também, que a proteína plasmática total e a contagem diferencial de leucócitos não foram influenciadas pelos diferentes níveis de suplementação.

Verlhac e Gabaudan (1994) descreveram a ação da vitamina C nas funções imunes por meio da proteção contra radicais livres, associados à atividade respiratória dos macrófagos, quimiotaxia, síntese de anticorpos e interferon. Houve auxílio, ainda, na manutenção da integridade das células imune protegendo-as da oxidação, sendo que altas quantidades desta vitamina são estocadas dentro dessas células e que, a deficiência determina diminuição das funções imune e aumento da susceptibilidade à infecção bacteriana.

A suplementação com vitamina C na dieta acima do recomendado contribuiu para a eficácia da vacina contra *Flavobacterium columnare* na tilápia do Nilo, reduzindo o estresse e potencializando os mecanismos de defesa orgânica (Pilarski, 2006). Li et al. (1998) não observaram diferenças significativas na produção de anticorpos em bagre do canal infectados por *Edwardsiella ictaluri* e arraçoados com dietas suplementadas com 3 a 256 mg de vitamina C/kg da dieta.

Lall et al. (1990) não encontraram melhora na resistência a doença e na produção de anticorpos para o salmão do Atlântico infectado com *Aeromonas salmonicida* ou *Vibrio anguillarum* quando receberam doses elevadas de ácido L-ascórbico cristalino (2980 mg de vitamina C/kg da dieta). Entretanto, Shanks et al. (1991), trabalhando com salmão “coho”, alimentados com dietas suplementadas com níveis de vitamina C acima do recomendado, observaram diminuição das infecções bacterianas e aumento do valor percentual do hematócrito.

Dietas suplementadas com níveis acima do recomendado de vitamina C para o ciclídeo mexicano, *Cichlasoma urophthalmus*, mostraram efeito significativo para manter a boa saúde e prevenir doenças, sendo o nível mínimo encontrado de 110 mg de vitamina C/kg da dieta (Martinez, 1990).

Experimentos realizados com juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, alimentados com dietas suplementadas com vitamina C demonstraram aceleração no processo de cicatrização (Petric, 2000). Jauncey et al. (1985) testaram três níveis de suplementação de ácido ascórbico (0; 125 e 400 mg de vitamina C/100 g da dieta), em relação à cicatrização de ferimento na musculatura da tilápia do Nilo. Observaram processo de cicatrização acelerado nos peixes que receberam suplementação recomendada e acima desta, em relação aos peixes



que receberam suplementação abaixo do recomendado.

O uso de parâmetros hematológicos, como indicadores de saúde, foi proposto por Hesser (1960). Porém, esta técnica tem sido modestamente, utilizada em sistemas de produção. Contudo, Ranzani-Paiva et al. (2004), ressaltaram que, avaliações sanguíneas relacionadas a respostas fisiológicas dos peixes, têm sido freqüentemente adotadas por pesquisadores.

Johnson e Ainsworth (1991) não observaram diferenças significativas na quantidade de neutrófilos e na porcentagem de fagocitose no rim anterior de bagre do canal arraçados com dietas suplementadas com 100 ou 1000 mg de vitamina C/kg. Sato et al. (1978) avaliaram os parâmetros hematológicos da carpa comum, comparando a suplementação de 2000 mg de vitamina C/kg da dieta com a ausência, sendo que não foi observada diferença significativa. Barros et al. (2002) observaram que existiu influência do nível de vitamina C no aumento da porcentagem de hematócrito, sendo o valor deste incrementado com o aumento do nível dessa vitamina. Observaram, porém, que esse aumento ocorreu em virtude do maior volume corpuscular médio das células, demonstrando que doses elevadas de vitamina C promoveram a liberação de células imaturas para a circulação. Os autores, entretanto, não determinaram efeito significativo nos valores de eritrócitos, hemoglobina e proteína plasmática total, enfatizando a necessidade de novas pesquisas que possam esclarecer melhor a ação dessa vitamina sobre as características hematológicas da tilápia do Nilo.

A influência da suplementação acima do recomendado para truta arco-íris e salmão do Atlântico sobre o número total de leucócitos foi demonstrado por Verlhac e Gabaudan (1994). Peixes que receberam dietas suplementadas com 1000 mg de vitamina C/kg de dieta tiveram aumento significativo das células brancas em relação aos peixes que receberam 60 mg de vitamina C/kg da dieta. Segundo Lim et al. (2005), dietas suplementadas com níveis elevados dessa vitamina têm sido utilizadas para aumentar a resposta imune e a resistência a doenças em salmonídeos.

A literatura relata também a inter-relação da vitamina C com minerais, vitaminas e imunoestimulantes (Li e Robinson, 2001). Lim et al. (2000) observaram interação significativa entre o ácido ascórbico e o mineral ferro para alguns parâmetros sanguíneos como número total de leucócitos, eritrócitos, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina. Foi ainda relatada interação significativa para a porcentagem de sobrevivência, com efeito estimulador na quimiotaxia dos macrófagos quando da suplementação com níveis elevados de vitamina C. Barros et al. (2002) avaliaram os efeitos dos níveis de vitamina C (125; 375 e 1115 mg de vitamina C/kg da dieta) e níveis de ferro (30; 90 e 270 mg/kg da

dieta) em dietas purificadas a base de albumina e gelatina para tilápia do Nilo, por 73 dias. Não observaram inter-relação significativa da vitamina C e ferro nos parâmetros de desempenho produtivos e hematológicos.

A inter-relação entre a vitamina C e o ácido fólico também foi demonstrada para o bagre do canal, sendo que a suplementação dietária com níveis elevados (200 mg de vitamina C/kg e 4 mg de ácido fólico/kg) proporcionaram máxima sobrevivência e produção de anticorpos quando desafiados com a bactéria *Edwardsiella ictaluri* (Duncan e Lovell, 1994). Wahli et al. (1998) estudaram o efeito da suplementação de vitamina C e E sobre o sistema imune não específico de trutas arco-íris, e observaram que altos níveis dessas vitaminas (2000 mg de vitamina C/kg da dieta e 800 mg de  $\alpha$ -tocoferol/kg da dieta) proporcionaram inter-relação significativa, estimulando a proliferação de linfócitos e aumentando a atividade respiratória dos macrófagos. Os autores também relataram significativa sobrevivência quando infectados com o vírus da septicemia hemorrágica.

Outro aspecto interessante relacionando a inter-relação dessas vitaminas antioxidantes envolve o mecanismo de defesa do sistema imune, mais precisamente o sistema complemento. Segundo Blazer (1992), as concentrações dietéticas de vitamina C superiores as recomendadas para o máximo crescimento podem aumentar a resistência a infecções e este aumento ocorre principalmente devido ao efeito benéfico sobre o sistema imune não específico, como a fagocitose e a atividade do complemento.

Desta forma, Ortuno et al. (2000) sugeriram que o adequado balanço da suplementação de vitamina C e E influencia na proteção contra oxidação dos fatores do complemento, aumentando dessa maneira, a atividade desse sistema. Igualmente, Chen et al. (2004) inferiram que a atividade do sistema complemento pela via alternativa está correlacionada com a concentração de vitamina C nos tecidos.

## **5. ESTRESSE EM PEIXES**

Em animais vertebrados, estresse é definido como estágio ou condição na qual a homeostase do animal é alterada como resultado de ação externa denominada agente estressor (Reddy e Leatherland, 1998). Segundo Jobling (1994), os sistemas fisiológicos dos peixes podem ser desafiados ou estressados por vários fatores. O termo estressor pode ser utilizado para descrever esses fatores se o desafio for suficientemente severo para determinar a resposta fisiológica compensatória. Essa resposta é considerada reação adaptativa que melhora a chance de sobrevivência diante de situação nociva ou desafiadora.

A exposição ao agente estressor resulta em ajustes imediatos desencadeados nos diversos níveis da organização metabólica, iniciando predominantemente com mudanças no comportamento. Esses ajustes têm custo energético e buscam minimizar os efeitos orgânicos impostos pelo agente estressor (Val et al., 2005).

Em resposta ao agente estressor o organismo promove cascata de eventos para tentar manter a homeostase. Segundo Pickering (1981), as respostas ao estresse podem ser classificadas em primária (aguda), secundária (crônica) e terciária (crônica prolongada). A resposta primária envolve a ativação do sistema neuroendócrino, com a liberação das catecolaminas e o aumento da liberação, pelo eixo hipotálamo-hipofíse-interrenal (HPI), do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e dos hormônios corticóides. A resposta secundária inclui mudanças fisiológicas em decorrência da liberação dos hormônios como aumento da pressão sanguínea, maior oxigenação e mobilização das reservas de energia. Em decorrência desses fatores, a resposta terciária envolve todo o organismo animal, onde o crescimento, a reprodução e o sistema imune são comprometidos (Wedemeyer et al., 1990). Segundo Val et al. (2005), a fase de desenvolvimento do peixe e a dieta podem interferir nas respostas secundárias.

Essa descrição foi também apresentada por outros autores. Donaldson (1981) relatou que a ativação do sistema neuroendócrino em peixes dispara o “gatilho” que libera as catecolaminas e os hormônios corticosteróides. Isso determina a mobilização de carboidratos e lipídeos de reserva, além de estimular a produção de energia via gliconeogênese (Suarez e Mommsen, 1988). Segundo Barton e Iwama (1991), mudanças nos níveis de catecolaminas, hormônios corticosteróides e nutrientes no sangue podem ser utilizadas para monitorar respostas ao estresse.

O elevado nível de cortisol plasmático em peixes submetidos a estresse ocasiona a gliconeogênese que, por sua vez, estimula a mobilização de aminoácidos e lipídeos para

servirem de substrato para a produção de energia (Vijayan et al., 1994). Esta redistribuição de energia confirma indiretamente a influência sobre a taxa de crescimento dos peixes e o fator de condição (Pickering e Duston, 1983; Barton et al., 1987; Foo e Lam, 1993).

Segundo Fryer e Peter (1977), falhas na resposta do cortisol podem ocorrer devido ao “feedback” negativo do hormônio no hipotálamo, o qual suprime o hormônio adrenocorticotrófico. Laidley et al. (1988) ressaltaram que em situações onde os peixes são submetidos a estresse crônico, o nível de cortisol não sofre necessariamente alteração.

Wedemeyer et al. (1990) descreveram que níveis plasmáticos de cortisol aumentam após alguns minutos em situações de estresse agudo, retornando aos níveis basais em uma hora. O mesmo não ocorre quando o peixe sofre estresse crônico, sendo que o nível de cortisol permanece elevado por longo período. Outra forma de se avaliar a intensidade do estresse usualmente utilizada em peixes é por meio da determinação do nível de glicose no sangue. Este parâmetro é de simples determinação e de baixo custo, sendo bom indicador da resposta secundária do peixe ao estresse.

Vijayan e Leatherland (1989) demonstraram com salmão “coho”, que o cortisol diminui os níveis de reservas de carboidrato, particularmente os estoques de glicogênio hepático. Estas reservas são de extrema importância para suprir as necessidades de energia em situações de estresse. Desta maneira, é de fundamental importância que o peixe esteja com boas reservas para suportar curto período de estresse, como durante o inverno, quando a temperatura da água sofre mudanças bruscas. Talbot (1993) destacou a importância dos constituintes das dietas para peixes, uma vez que esses podem influenciar o nível plasmático desses hormônios e das enzimas do metabolismo intermediário.

Peixes submetidos a situações de estresse possuem menor resistência a doenças, em decorrência da imunossupressão exercida pelos agentes estressores (Pickering e Duston, 1983; Maule et al., 1989). Woo et al. (1987) demonstraram que trutas arco-íris implantadas com cortisol são mais suscetíveis ao parasito *Cryptobia salmositica* e liberaram menos anticorpos em relação ao tratamento controle. Pickering e Pottinger (1985) observaram linfocitopenia em trutas marron que possuíam altos níveis de cortisol. O mesmo foi observado em bagre do canal com elevação crônica de cortisol (Ellsaesser e Clem, 1987).

Em sistemas de produção intensivo o estresse causado por fatores ambientais ocorre paralelamente durante a produção, tornando-se estresse crônico. Este estado leva a contínua perda da homeostase fisiológica, com redução do crescimento e da capacidade reprodutiva, além da supressão do sistema imune, tornando o peixe susceptível a doenças e ao aumento da mortalidade (Wendelaar-Bonga, 1997; Van Weerd e Komen, 1998). Com a intensificação da

criação de peixes, diferentes fatores estressores se apresentam; dessa maneira, é essencial que o sistema imune funcione adequadamente para garantir a saúde e as condições fisiológicas dos peixes cultivados (Urbinati e Carneiro, 2004).

Segundo Nagae et al. (1994), as imunoglobulinas (IgM) participam de forma importante na resposta do sistema imunológico, neutralizando as bactérias e tornando-as mais suscetíveis a fagocitose. A concentração de IgM plasmática diminuiu significativamente em salmão “masu”, *Oncorhynchus masou*, quando da administração de cortisol, reforçando a hipótese de que o aumento da suscetibilidade à infecção em peixes submetidos a estresse é conseqüência do efeito do cortisol sobre a produção de IgM.

Macrófagos em peixes realizam a fagocitose, liberam citocinas e fazem a apresentação do antígeno para o linfócito. A modulação da atividade destas funções pode afetar a imunocompetência e, por conseqüente, tornar o peixe suscetível a doenças (MacArthur e Fletcher, 1985). Narnaware et al. (1994) demonstraram que estresse agudo pode levar a supressão da atividade do macrófago no rim e no baço de truta arco-íris, em virtude da liberação de altos níveis de catecolaminas e cortisol.

Segundo Urbinati e Carneiro (2004), ocorrem intensas interações entre o sistema endócrino, envolvido nas respostas de estresse, e o sistema imunológico, envolvido na proteção e resistência orgânica dos peixes. Em situações de estresse outros hormônios não corticóides também sofrem alterações, tais como hormônio do crescimento, prolactina, triiodotironina ( $T_3$ ) e tetraiodotironina ( $T_4$ ). Estas alterações ainda não estão claramente elucidadas. Pesquisas demonstraram inconsistência de resultados, não tendo sido determinada a verdadeira razão para tal alteração, ou seja, se ocorreu por causa do alto nível de cortisol ou em virtude da alteração do metabolismo intermediário (Reddy e Leatherland, 1998).

Peixes submetidos a estresses ambientais por longo período podem morrer ou se adaptar, quando os níveis de cortisol e ACTH retornam próximos aos do período pré-estresse, podendo permanecer desta maneira durante dias ou até meses (Schreck, 1981). Esta possibilidade de adaptação em relação à performance pode levar o peixe a duas situações distintas: a exaustão e conseqüentemente a morte ou a menor performance em relação ao período pré-estresse (Reddy e Leatherland, 1998).

A exposição dos peixes a mais de um agente estressor pode prejudicar as atividades normais, tornando-os vulneráveis a doenças, quando comparados a peixes expostos apenas a um agente estressor (Barton e Schreck, 1987). Olla et al. (1998) observaram alta mortalidade em peixes capturados e depois soltos, quando no momento da captura a temperatura da água

era elevada ao nível de desconforto, em relação aos peixes capturados que não sofreram esse estresse. Segundo Crawshaw (1980), a termoregulação dos peixes é ativada em segundos ou minutos após estresse por temperatura, mas a adaptação pode levar horas, dias ou semanas. As variações de temperaturas da água de cultivo são fator ambiental de destaque e, quando abruptas, segundo Davis e Parker (1990), pode levar à condição de estresse nos peixes determinando o aumento da glicose plasmática e do nível de cortisol e diminuição dos teores de eletrólitos plasmáticos. Wedemeyer (1969) observou que o choque térmico em trutas arco-íris provocou redução dos teores de ácido ascórbico no rim anterior e aumento dos níveis de cortisol plasmático da ordem de 10 vezes.

As respostas fisiológicas do estresse como liberação de catecolaminas e cortisol causam constrição do baço e aumento do fluxo sanguíneo. Como consequência, ocorre eritrocitose, trombocitose, hiperproteinose e linfopenia (McDonald e Milligan, 1992). Para cada parâmetro sanguíneo existe uma zona de tolerância onde se torna possível o animal manter certa resistência a mudanças ambientais. Fisiologicamente, o organismo tenta manter os parâmetros sanguíneos na zona de homeostase. Se essas mudanças ambientais persistirem por muito tempo e excederem o limite de resistência, o animal pode morrer (Reddy e Leatherland, 1998).

Segundo Lochmiller et al. (1989), os parâmetros hematológicos sofrem variações de acordo com as estações do ano. Em experimento com *Morone saxatilis*, o número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média foram elevadas no outono e inverno em relação ao verão. De maneira oposta, Joshi (1981) relatou que baixas temperaturas podem causar eritrocitopenia em peixes.

A literatura também apresenta pesquisas desenvolvidas com a vitamina C objetivando a avaliação de respostas ao estresse. Várias condições associadas à aquicultura resultam em mudanças fisiológicas nos peixes, determinando diferentes respostas ao estresse. Baixa qualidade da água, doenças, manejo, densidade e mudança extrema da temperatura da água, entre outros, são considerados indutores de estresse. O aumento do metabolismo durante situações de estresse gera a redistribuição e maior demanda por vitaminas (Lovell, 1998). Segundo Wedemeyer (1969), este aumento na exigência é especialmente indicado para a vitamina C, a qual é utilizada na síntese do cortisol.

Wedemeyer (1969) observou queda do nível de ácido ascórbico no tecido e aumento na produção de cortisol no sangue de salmão do Atlântico e truta arco-íris quando submetidos à condição de estresse. Li e Robinson (2001) demonstraram que o ácido ascórbico age na síntese dos hormônios corticóides. Embora Hardie et al. (1991) tenham determinado que altos

níveis de vitamina C na dieta diminuíam os efeitos fisiológicos do estresse, pesquisas desenvolvidas com a carpa comum, bagre do canal e salmão do Atlântico não demonstraram correlação entre o nível de ácido ascórbico e a concentração plasmática de cortisol ou de glicose (Dabrowska et al., 1991; Davies et al., 1998; Li et al., 1998).

Wahli et al. (1986) e Rasheed (1989) demonstraram que infecções por protozoários poderiam ser evitadas ou reduzidas por meio da suplementação com vitamina C na dieta. Montero et al. (1999) relataram que a suplementação de vitamina C atuou na prevenção da imunossupressão relacionada ao estresse em juvenis de *Sparus aurata* estocados em altas densidades.

Larvas de linguado e de robalo alimentadas com 2000 mg de vitamina C/kg da dieta demonstram maior taxa de sobrevivência, menor índice cumulativo de estresse e maior biomassa final quando expostas a alta salinidade (Merchie et al., 1996).

Blom e Dabrowski (2000) determinaram a suplementação de 360 mg de vitamina C/kg da dieta para acará bandeira, *Pterophylum scalare*, para manter o máximo estoque desta vitamina nos tecidos, proporcionando assim, maior sobrevivência dos peixes nos aquários. Ortuno et al. (2002) avaliando o efeito da suplementação de vitaminas C e E em dourada submetida a múltiplo estresse, observaram queda de 33,0% no nível de cortisol do tratamento que recebeu suplementação de 300 mg de vitamina C/kg da dieta ou 120 mg de vitamina E/kg da dieta em relação ao controle (ausente de suplementação) e 50,0% menor no tratamento que recebeu suplementação de ambas as vitaminas em relação ao controle.

Na aqüicultura variações de temperatura da água são frequentes e a adaptação a esta situação faz parte da fisiologia dos peixes. Porém, com a intensificação da produção essas variações tornaram-se mais um fator crítico relacionado ao estresse com conseqüente supressão do sistema imune dos peixes. Estudos para determinação da exigência nutricional da vitamina C em diferentes temperaturas da água têm sido desenvolvidos. Li e Robinson (1994) estudaram o efeito da suplementação de vitamina C em relação à concentração da vitamina nos tecidos de bagre do canal submetidos às temperaturas de 31,0 e 10,0°C. Concluíram que a concentração desta vitamina no fígado, quando os peixes estão sob situação de estresse, tal como a passagem do verão para o inverno diminui drasticamente, sendo, desta forma, importante manter a reserva dessa vitamina em períodos que antecedem a queda de temperatura.

Durve e Lovell (1982) relataram que a suplementação de 150 mg de vitamina C/kg da dieta para bagre do canal aumentou significativamente a resistência contra *Edwardsiella tarda* em relação a suplementação com 60 mg/kg em temperatura da água de 23,0°C comparado

com 33,0°C. Ressaltaram ainda os autores que em temperaturas baixas a necessidade de vitamina C aumenta em virtude da diminuição da resistência dos peixes. Hwang e Lin (2002), avaliando o efeito de duas temperaturas (25,0 e 35,0°C) em relação à exigência de vitamina C para carpa comum, observaram que a necessidade dessa vitamina aumentou conforme a elevação da temperatura.

Martins (2000) observou valores de hematócrito e número de eritrócitos significativamente maiores em pacu durante época fria, independentemente da suplementação ou não com vitamina C. O mesmo autor destacou que os peixes submetidos ao estresse apresentaram aumento da contagem total de eritrócitos na época fria, e da taxa de hemoglobina, na época quente. Quando comparou os tratamentos, observou que peixes alimentados com dietas ausente de suplementação de vitamina C e estressados possuíam diminuição significativa da taxa de hemoglobina em relação ao tratamento que recebeu dieta suplementada com vitamina C.

Hrubec et al. (2000) avaliando o efeito da temperatura sobre os parâmetros hematológicos em híbridos de “striped bass”, *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*, observaram que a proteína plasmática total foi significativamente maior a 29,0°C em relação a temperaturas menores. Alterações no perfil hematológico também são observadas em peixes submetidos ao transporte, com ocorrência de linfopenia e neutrofilia, além de possíveis alterações no número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina (Carneiro, 2001; Urbinati e Carneiro, 2004).

Assim como diversos fatores ambientais causam estresse nos peixes cultivados, fatores inerentes a produção também induzem a situações de estresse; dentre esses destacam-se a densidade de estocagem, alimentação, interação entre as espécies e transporte. Estes fatores podem, dependendo da intensidade do estresse, desencadear estresse agudo ou crônico (Urbinati e Carneiro, 2004).

Segundo Robertson et al. (1988), o processo de transporte compreende diversas etapas que podem causar estresse nos peixes. Como agente estressor, o transporte desencadeia nos peixes respostas primárias e secundárias para tentar manter a homeostase. Entretanto, em virtude das diversas etapas: despesca, carregamento, transporte propriamente dito e soltura dos animais, além do manejo alimentar, muitas vezes os peixes tornam-se susceptíveis a doenças em virtude do estresse em alguma etapa do procedimento (Carneiro, 2001).

Níveis elevados de cortisol foram observados em salmão do Atlântico e truta arco-íris submetidos a estresse por transporte, sendo que os níveis plasmáticos retornaram aos parâmetros iniciais após alguns dias (Barton et al., 1980; Iversen et al., 1998). Carneiro (2001)



também observou elevação significativa nos níveis de cortisol após o transporte de matrinxã, *Brycon cephalus*, retornando aos níveis iniciais 24 horas depois.

Em virtude da resposta secundária desencadeada pelos peixes submetidos a transporte, a concentração de glicose plasmática também aumenta para suprir a maior demanda energética em situações de estresse (Morgan e Iwama, 1997). Disfunções osmorregulatórias podem ocorrer com frequência durante o transporte. Este distúrbio eletrolítico é causador do aumento de mortalidade nos peixes após o transporte. Alterações nas concentrações plasmáticas de sódio, potássio e cloreto são frequentes durante o procedimento de transporte em peixes (McDonald e Milligan, 1997). Igualmente, ocorre aumento de amônia plasmática durante o transporte que pode ocasionar problemas fisiológicos devido a alteração no equilíbrio ácido-base, agravando dessa forma os distúrbios eletrolíticos desencadeados pelo estresse (El-Shafey, 1998).

Com o objetivo de prevenir o efeito do estresse em truta arco-íris, Jeney et al. (1997), suplementaram a dieta com 0,0; 0,1; 0,5 e 1,0% de glucano e avaliaram os efeitos nos mecanismos de defesa não específicos desse peixe. Os resultados demonstraram que baixas doses de glucano administrados em dietas para trutas arco-íris semanas antes do transporte podem prevenir os efeitos negativos do estresse. Estes autores também destacaram que altas doses podem provocar inibição do sistema imunológico no período pós-estresse.

#### *Aeromonas hydrophila*

As doenças de peixes são fatores limitantes no desenvolvimento da produção, aparecendo com maior frequência nos sistemas intensivos, onde as bactérias dentre os vários patógenos, provavelmente constituam o grupo com maior potencial causador de prejuízos econômicos na aquicultura (Frerichs e Millar, 1993). As doenças bacterianas em peixes são frequentes, porém, a escassez de diagnóstico bacteriológico dificulta o dimensionamento das perdas que devem ser elevadas (Post, 1987; Kinkelin et al., 1991).

Nos sistemas intensivos de criação o aparecimento de diversos patógenos está diretamente relacionado à condição de estresse a qual os peixes estão expostos. Desta forma, inúmeras doenças ocorrem, dentre as principais incluem-se os parasitas protozoários, fungos, vírus e bactérias oportunistas e obrigatórias. Dentre estas, se destacam as bactérias patogênicas facultativas ou oportunistas, como a bactéria *Aeromonas hydrophila* (Belem-Costa, 2003). Bactérias oportunistas podem tornar-se patogênicas em casos de estresse e podem resultar em morte dos peixes (Shama et al., 2000).

As bactérias do gênero *Aeromonas* são um dos principais agentes com potencial patogênico que causam perdas consideráveis em pisciculturas. Estão presentes naturalmente em ecossistemas aquáticos, tropicais e temperados, fazendo parte da microbiota da água de rios e tanques, podendo aumentar seu potencial patogênico quando as condições físicas e químicas do ambiente estiverem alteradas (Walters e Plumb, 1980; Camus et al., 1998). Igualmente, Barja e Esteves (1988) relataram que quando há desequilíbrio dos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente, o patógeno *Aeromonas hydrophila* pode desencadear surtos epidêmicos em animais.

As espécies de bactérias classificadas como gênero *Aeromonas* que causam problemas em peixes de água doce são: *Aeromonas hydrophila*, *A. sóbria* e *A. cavia* (Belem-Costa, 2001). Inglis et al. (1993) referiram que surtos causados por estas bactérias normalmente estão associados com estresse, o qual pode ser causado por temperaturas elevadas, bruscas oscilações térmicas e grande intensidade de parasitose (Pavanelli et al., 2002). A maioria desses microorganismos são naturalmente saprófitas que utilizam a matéria orgânica e mineral do ecossistema aquático para seu crescimento e multiplicação, além de fazer parte da microbiota da pele, brânquias e intestino dos peixes (Swann e White, 1989).

No Brasil, as bactérias do gênero *Aeromonas* são descritas como patógenos emergentes de importância crescente em alimentos (Bojjink e Brandão, 2001). Rall et al. (1998) recolheram pintado, *Pseudoplatystoma* sp., de diversos pontos comerciais na cidade de São Paulo e observaram teste positivo para *Aeromonas* em 48,0% dos peixes. Semelhantemente, Shama et al. (2000) isolaram e identificaram em jundiás, *Rhamdia quelen*, criados em tanque em Santa Maria (RS) bactérias patogênicas, sendo que a *Aeromonas hydrophila* apareceu em 6,0% dos peixes examinados. Inglis et al. (1993) também encontraram essa bactéria no fígado e rim de trutas arco-íris aparentemente saudáveis. Igualmente, MacMillan (1985) relatou que essa bactéria é comumente isolada da superfície da pele, do muco e de órgãos de peixes clinicamente saudáveis.

A bactéria *Aeromonas hydrophila* é descrita na literatura como bacilo gram-negativo, que possui flagelo móvel. É considerada aeróbia, citocromooxidase positiva, fermentadora de glicose, aeróbia ou anaerobiamente. Cresce em meios simples e as colônias são redondas, brilhantes e de coloração creme. As colônias crescem de um a três milímetros de diâmetro a 25,0°C em 48 horas, podendo crescer a temperaturas de até 37,0°C, em período mais prolongado (Carnevia, 1993; Alexandrino et al., 2000).

Infecção por *Aeromonas* móveis, como a *Aeromonas hydrophila*, é provavelmente a doença bacteriana mais comum em peixes de água doce (Noga, 2000). É causadora da

septicemia hemorrágica bacteriana, doença responsável por muitas ocorrências de mortalidade em sistemas intensivos de produção de peixes (Austin e Austin, 1988; Lee et al., 1997). Essa bactéria afeta diversas espécies de peixes, sendo as trutas e os ciprinídeos os mais susceptíveis (Pastor e Franco, 1981).

Segundo Richards e Roberts (1978), os métodos de cultivo intensivo induzem ao estresse, e os bacilos gram-negativos são os que provocam maior mortalidade. A transmissão do agente infeccioso ocorre de modo horizontal, podendo ocorrer por meio da introdução das bactérias presentes em secreções, excreções, restos de peixes e/ou animais em decomposição e lesões cutâneas abertas. Como esse agente é habitante natural da água, os peixes debilitados estarão susceptíveis a contrair infecção bacteriana. Também são fontes de transmissão os indivíduos clinicamente afetados e os portadores latentes. Aoki (1999) destacou que existem inúmeras linhagens de *Aeromonas hydrophila* com alta ou baixa ação patogênica, dependendo da sua virulência, além da resistência intrínseca da espécie de peixe, relacionada principalmente a genética, como outros fatores que também podem afetar o aparecimento ou não da doença.

Diversos sinais clínicos podem ser observados em peixes infectados com *Aeromonas hydrophila*, tais como perda de apetite, apatia, perda de equilíbrio, hemorragias ao longo do corpo, lesões epidérmicas como despigmentação, necroses da pele, úlceras com exposição da musculatura e alterações no comportamento. Internamente, os órgãos podem estar friáveis e esbranquiçados, com necroses do tecido hematopoiético dos rins e baço, cavidade peritoneal com exsudato, intestino flácido com muco amarelo e sem alimento (Roberts, 1993; Plumb, 1994; Aoki, 1999). Boijink e Brandão (2001) em experimento com jundiá inoculados por injeção intramuscular com bactéria *Aeromonas hydrophila*, observaram comportamento alterado, com perda de equilíbrio e movimentos respiratórios lentos nas horas que antecederam a morte. Os peixes mortos apresentaram ascite contendo fluido mucoso amarelado, exoftalmia, coloração anormal e erosão nas nadadeiras, além de apresentarem úlceras com bordas avermelhadas no local da inoculação e brânquias e demais órgão internos pálidos e flácidos.

McDaniel (1979) relatou que a infecção por *Aeromonas hydrophila* pode ocorrer de quatro formas: superaguda e aguda, caracterizadas pela alta porcentagem de mortalidade e extensas lesões hemorrágicas internas, e subaguda e crônica, com hemorragias nas brânquias e órgãos internos e presença de fluido contendo sangue na cavidade abdominal.

Segundo Hoshina (1962), os peixes doentes apresentam hemorragias cutâneas nas nadadeiras, condição geralmente inferida como “red fin disease”, além de provocar corrosão

nas mesmas. Inglis et al. (1993) relataram que essa bactéria pode levar ao quadro de septicemia hemorrágica, que dependendo de sua extensão, pode causar no peixe coloração avermelhada. Em alguns casos, quando da infecção por essa bactéria, o quadro clínico pode variar significativamente dependendo do estado de saúde dos peixes; isto é, dependendo da resistência, podendo morrer rapidamente ou se recuperar (Schlotfeldt e Alderman, 1995). Vale ressaltar que esses sinais clínicos aparecem na maioria das infecções bacterianas, obviamente cada qual com sua peculiaridade. Assim, testes bioquímicos são necessários para reconhecer a bactéria (Camus et al., 1998).

Segundo a “Food and Drug Administration – FDA” (1999), esta bactéria pode causar infecções também em humanos pela ingestão de um número suficiente de bastonetes com o alimento ou água. Sua gravidade está relacionada ao fato de se tratar de uma zoonose (Alexandrino et al., 2000). No homem, determina gastroenterite, meningite, úlcera de córnea e, sobretudo, enfermidades respiratória e intestinal.

Segundo Swann e White (1989), a melhor prevenção contra a infecção por *Aeromonas hydrophila* é minimizar os fatores que podem causar estresse nos peixes, tais como manejo durante a despesca e biometria, densidade, qualidade de água, balanço nutricional e transporte, adequando-os aos níveis ideais. Quando da infecção por *Aeromonas hydrophila* a literatura recomenda, segundo os mesmos autores, a utilização de medicamentos adicionados a dieta, como a sulfamerazine e a oxitetraciclina. Entretanto, segundo Belem-Costa e Cyrino (2006), um dos principais problemas envolvendo tratamento com antibióticos contra essa bactéria é a rápida resistência que a mesma desenvolve frente aos diferentes antibióticos. Os mesmos autores alertaram que o uso de antibióticos nos sistemas de produção de peixes no Brasil irá desenvolver diferentes linhagens de bactérias resistentes. No mesmo sentido, Swann e White (1989) destacaram que os problemas associados a terapia com antibióticos também estão relacionados com superdosagem ou subdosagem, além de possíveis problemas ambientais, com aumento da resistência das bactérias, como destacado anteriormente.

Poucos trabalhos relacionam especificamente a suplementação de micronutrientes com a resistência a essa bactéria. Neste sentido, Nitzan et al. (1996) estudaram o efeito da suplementação de ácido ascórbico polifosfatado (AAPP) em híbridos de tilápia, *Oreochromis aureus* x *Oreochromis niloticus*, submetidos ao desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila* e não constataram efeito significativo da suplementação em relação à porcentagem de sobrevivência. Neste mesmo experimento, também foi avaliado o efeito da suplementação dessa vitamina nos híbridos submetidos à temperatura de inverno, onde observaram tendência de maior ganho de peso nos peixes alimentados com rações suplementadas em relação ao

tratamento ausente de suplementação. O mesmo não ocorreu com a concentração dessa vitamina no fígado, sendo esta significativamente maior nos peixes que receberam suplementação.

Sobhana et al. (2002) avaliaram o efeito da suplementação de níveis elevados de vitamina C em dietas para carpa, *Cirrhinus mrigala*, desafiadas com *Aeromonas hydrophila*, demonstrando que a suplementação de vitamina C aumentou significativamente a sobrevivência, a atividade fagocítica e a resistência contra esse agente patogênico. Os autores também inferiram a ação da vitamina C como agente antioxidante sobre os neutrófilos e outros fagócitos durante a atividade respiratória, permitindo assim, aumento da eficiência do sistema imune.

Com base nessas informações este estudo está apresentado em dois capítulos intitulados:

Capítulo 2 – “Nível de suplementação de  $\beta$ -glucano e vitamina C em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos” objetivando caracterizar os efeitos de níveis de suplementação de  $\beta$ -glucano e vitamina C por meio do desempenho produtivo (ganho de peso, conversão alimentar aparente e porcentagem de sobrevivência) e parâmetros fisiológicos (hemograma, leucograma e produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio); do estímulo pelo frio (hemograma, leucograma e produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio) e do desafio com *Aeromonas hydrophila* (sobrevivência e produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio).

Capítulo 3 – “Tempo de administração de  $\beta$ -glucano e vitamina C para tilápia do Nilo: parâmetros fisiopatológicos” objetivando determinar o melhor tempo de administração, em função do nível determinado no estudo I, por meio de parâmetros hematológicos, imunológicos (determinação de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio), porcentagem de sobrevivência e concentração de vitamina C no fígado, quando submetidos ao estímulo pelo frio, estresse por transporte e desafio com *Aeromonas hydrophila*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- ABDELGHANY, A. Growth response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to dietary L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate, and L-ascorbyl-2-polyphosphate. *J. World Aquacult. Soc.*, v. 27, p.449-455, 1996.
- AGRAWAL, N.K.; MAHAJAN, C.L. Nutritional deficiency disease in an Indian major carp *Cirrhina mrigala* H., due to avitaminosis C during early growth. *J. Fish Dis.*, v.3, p.231-48, 1980.
- 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. *Bol. Inst. Pesca*, v.26, n.1, p.117-119, 2000.
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.2, p.281-307, 1992.
- AOKI, T. Motile *Aeromonads* (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. *Fish Dis. Diso.*, v.3, p.427-453, 1999.
- ASSEM, S.S.; EL-ZAEEM, S. Application of biotechnology in fish breeding. II: production of highly immune genetically modified redbelly tilapia, *Tilapia zillii*. *Afr. J. Biotechnol.*, v.4, n.5, p.449-459, 2005.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. *Patologia en acuicultura*. In: BARJA, J.L.; ESTEVES, A.T. *Enfermedades bacterianas*, Madrid: Caicy, 1988. 550p.
- BAGNI, M.; AMADORI, M.; MARINO, G. Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Vet. Med.*, v.47, p.745-751, 2000.
- BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. p.213-225.
- BARJA, J.L.; ESTEVES, A.T. *Enfermedades bacterianas. Patologia en acuicultura*. Madrid: Caicyt, 1988. 550p.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.; KLEEMANN, G.K. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.6, p.2149-2159, 2002.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.  
 BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.; FALCON, D.R.; GUIMARAES, I.G. Nutrição e saúde de peixes. In: Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, 2, 2006, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2006, Cd-rom.
- BARTON, B.A.; PETER, R.E.; PAULENCU, C.R. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairkneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, v.37, p.805-811, 1980.
- BARTON, B.A.; SCHRECK, C.B. Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead. *Trans. Ame. Fish. Soc.*, v.116, p.257-263, 1987.
- BARTON, B.A.; SCHRECK, C.B.; BARTON, L.D. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, v.2b, p.173-185, 1987.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of cortivosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.1, p.3-26, 1991.
- BAULNY, M.O.D.; QUENTEL, C.; FOURNIER, V.; LAMOUR, F.; GOUVELLO, R.L. Effect of long-term oral administration of  $\beta$ -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.*, v.26, p.139-147, 1996.
- BEISEL, W.R. Single nutrients and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.35, p.417-468, 1982.
- BEISEL, W.R. Nutrition and immune function: overview. *J. Nutr.*, v.126, p.2611S-2615S, 1996.
- 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.
- BELEM-COSTA, A. *Caracterização de bactérias do complexo Aeromonas isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica*. 2003. 54f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BELEM-COSTA, A.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Sci. Agric.*, v.63, n.3, p.281-284, 2006.
- BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVANS, D.H. *The physiology of fishes*. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.215-242.



- BLAZER, V.S. Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *J. Aquat. Anim. Health*, v.3, p.77-86, 1991.
- BLAZER, V.S. Nutrition and disease resistance in fish. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, p.309-323, 1992.
- BLAZER, V.S.; ANKLEY, G.T.; FINCO-KENT, D. Dietary influences on disease resistance factors in channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, v.13, p.43-48, 1989.
- BLOM, J.H.; DABROWSKI, K. Vitamin C requirement of the Angelfish, *Pterophylum scalare*. *J. World Aquacult. Soc.*, v.31, p.115-118, 2000.
- BLY, J.E.; CLEM, L.W. Temperature-mediated processes in teleost immunity: In vitro immunosuppression induced by in vivo low temperature in channel catfish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.28, p.365-377, 1991.
- BLY, J.E.; CLEM, L.W. Temperature adaptation of lymphocyte function in fish. In: COSSINS, A.R. (Ed.). *Temperature adaptation of biological membranes*, London: Portland Press, 1994. p.169-184.
- BLY, J.E.; QUINIOU, S.M.A.; CLEM, L.W. Environmental effects of fish immune mechanisms. In: GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; MIDTLYNG, P.J. (Ed.). *Fish vaccinology*. Basel: Karger, 1997. p.33-43.
- BOIJINK, C.L.; BRANDAO, D.A. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciênc. Rural*, v.31, n.3, 2001.
- BUDDINGTON, R.K.; PUCHAL, A.A.; HOUBE, K.L. Hydrolysis and absorption of two monophosphate derivatives of ascorbic acid by channel catfish *Ictalurus punctatus* intestine. *Aquaculture*, v.114, p.317-326, 1993.
- BURRELS, C.; WILLIAMS, P.D.; FORNO, P.F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds, effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture*, v.199, p.159-169, 2001.
- CAMUS, A.C.; DURBOROW, R.M.; HEMSTREET, W.G.; THUNE, R.L.; HAWKE, J.P. *Aeromonas* bacterial infections – Motile aeromonas septicemia. *South. Reg. Aquacul. Center*, n.478, p.1-4, 1998.
- CARNEIRO, P.C.F. *Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã, Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae). 2001. 145f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CARNEVIA, D. *Enfermedades de los peces ornamentales*. Buenos Aires: Agrivet, 1993. 319p.

- CARR, J. M.; GLATTER, S.; JERACI, J. L.; LEWIS, B. A. Enzymatic determination of  $\beta$ -glucan in cereal-based food-products. *Cereal Chem.*, v. 67, n. 3, p. 226-229, 1990.
- CASTRO, R.; PIAZZON, M.C.; ZARRA, I.; LEIRO, J.; NOYA, M.; LAMAS, J. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture*, v.254, p.9-20, 2006.
- CERENIUS, L.; LIANG, Z.; DUVIC, B.; KEYSER, P.; HELLMAN, U.; PALVA, E.T.; IWANAGA, S.; SODERHALL, K. Structure and biological activity of a 1,3  $\beta$ -glucan binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.*, v.269, n.47, p.29462-29467, 1994.
- CHANG, C.F.; CHEN, H.Y.; SU, M.S.; LIAO, I.C. Immunomodulation by dietary beta-1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.10, n.6, p.505-514, 2000.
- CHANG, C.F.; SU, M.S.; CHEN, H.Y.; LIAO, I.C. Dietary  $\beta$ -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, v.15, p.297-310, 2003.
- CHEN, D.; AINSWORTH, A.J. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, v.15, p.295-304, 1992.
- CHEN, R.G.; LOCHMANN, R.T.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.J. Effects of dietary vitamin C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentration and response to heat stress in juvenile golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, v.242, p.553-569, 2004.
- CHILMONCZYK, S. Evolution of the thymus in rainbow trout. In: MANNING, M.J.; TATNER, M.F. *Fish Immunology*, London: Academic Press, 1985. p.285-292.
- CLEM, L.W.; MILLER, N.W.; BLY, J.E. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. In: WARR, G.W.; COHEN, N. (Ed.). *Phylogenesis of Immune Functions*, Boca Raton: CRC Press, 1991. p.191-213.
- 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 Immunol.*, v.14, n.4, p.333-345, 2003.

- COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARINOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*, v.219, p.99-109, 2003.
- CRAWSHAW, L.I. Temperature regulation in vertebrate. *Annu. Rev. Physiol.*, v.42, p.473-491, 1980.
- DABROWSKA, H.; DABROWSKI, K.; MEYER-BURGDORFF, K.; HANKE, W.; GUNTHER, K.D. The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.89b, p.539-545, 1991.
- DABROWSKI, K.; MOREAU, R. Do all fish need ascorbic acid? *Fish, Feed & Nutr.*, v.22, p.96-8, 1996.
- DAVIS, K.B.; PARKER, N.C. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture*, v.91, p.349-358, 1990.
- DAVIS, K.B.; SIMCO, B.A.; LI, M.; ROBINSON, E. Effect of reduction of supplemental dietary vitamins on the stress response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. World Aquacult. Soc.*, v.29, p.319-324, 1998.
- DEXIANG, C.; AINSWORTH, A.J. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). II. Adaptation of anterior kidney phagocytes to 10°C. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.100A, p.913-918, 1991.
- DONALDSON, E.M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: PICKERING, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p.11-47.
- DUGGER, D.M.; JORY, D.E. Bio-modulation of the non-specific immune response in marine shrimp with beta-glucan. *Aquacult. Mag.*, v.1, p.81-9, 1999.
- DUNCAN, D. L.; LOVELL, R. T. Influence of vitamin C on the folate requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, for growth, hematopoiesis and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection. *Aquaculture*, v.127, p.233-244, 1994.
- DURVE, V.S.; LOVELL, R.T. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.39, p.948-951, 1982.
- EICHBAUM, F.W.; GUEDES, A.O.; NETO, J.P.; CARVALHO, F.V. Protecting effect of ascorbic acid in strychnine poisoning and in tetanus (fish, mice, rats). *Int. J. Vitamin Nutr. Res.*, v.16, p.31-39, 1977.
- ELLIS, A.E. The leucocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.*, v.11, p.453-491, 1977.
- ELLIS, A.E. The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. *Int. J. Tissue React.*, v.8, p.263-270, 1986.

- ELLIS, A.E.; DE SOUSA, M. Phylogeny of the lymphoid system. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *Eur. J. Immunol.*, v.4, p.338-343, 1974.
- ELLSAESSER, C.F.; CLEM, L.W. Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.87A, p.405-408, 1987.
- ELLSAESSER, C.F.; CLEM, L.W. Functionally distinct high and low molecular weight species of channel catfish and mouse IL-1. *Cytokine*, v.6, p.10-20, 1994.
- ELLSAESSER, C.F.; BLY, J.E.; CLEM, L.W. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. The thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, v.12, p.787-799, 1988.
- EL-SHAFFEY, A.A.M. Effect of ammonia on respiratory functions of blood of Tilapia zilli. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.121A, p.305-313, 1998.
- ENANE, N.A.; FRENKEL, K.; O'CONNOR, J.M.; SQUIBB, K.S.; ZELIKOFF, J.T. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology*, v.80, p.68-72, 1993.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, v.17, p.319-330, 1993.
- ERDAL, J.I.; EVENSEN, O.; KAURSTAD, O.K.; LILLEHAUG, 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.
- FDA - FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Center for food safety & applied nutrition (CFSAN). *Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook*. Rockville: FDA, 1999. p.1-3. Disponível em: <<http://www.fda.gov/homepage>>. Acesso em: 26/11/2006.
- FERNANDEZ, A.B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleosteos (I): Células y órganos. *Rev. AcuaTic*, v.16, 2002.
- FIGUERAS, A.; SANTAREM, M.M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of  $\beta$ -glucan and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.64, p.59-68, 1998.
- FJALESTAD, K.T.; GJEDREM, T.; GJERDE, B. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. *Aquaculture*, v.111, p.65-74, 1993.
- FLETCHER, T.C. Non-antibody molecules and the defense mechanisms of fish. In: PICKERING, A.D. (Ed.). *Stress and Fish*. New York: Academic Press, 1981. p.171-183.
- FLETCHER, T.C.; WHITE, A. Lysozyme activity in the plaice (*Pleurocnctes platessa* L.). *Experientia*, v.29, p.1283-1285, 1973.

- FLETCHER, T.C.; WHITE, A.; BALDO, B.A. C-reactive protein-like precipitin and lysozyme in the lump sucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.57B, p.353-357, 1977.
- FOO, J.T.W.; LAM, T.J. Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in tilapia, *Oreochromis mossambicus*, by cortisol implantation. *Aquaculture*, v.115, p.133-143, 1993.
- FRERICHS, G.N.; MILLAR, S.D. *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Stirling: Pisces Press, 1993, 60p.
- FRYER, J.N.; PETER, R.E. Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish. III. Hypothalamic cortisol implant studies. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.33, p.215-225, 1977.
- GANNAM, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in fish diets. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. p.235-260.
- GATLIN, D.M. Nutrition and fish health. In: HALVER, J.E., HARDY, R.W. (Ed.). *Fish Nutrition*. 3<sup>o</sup>ed. Amsterdam: Academic Press, 2002. p.671-702.
- GENÇ, H.; OZDEMIR, M.; DEMIRBAS, A. Analysis of mixed-linked (1-3), (1-4)- $\beta$ -D-glucans in cereals grains from Turkey. *Food Chem.*, v. 73, n. 3, p. 221-224, 2001.
- GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, v.167, p.103-113, 1998.
- GILDBERG, A.; JOHANSEN, A.; BOGWALD, J. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, v.138, p.23-34, 1995.
- GILDBERG, A.; BOGWALD, J.; JOHANSEN, A.; STENBERG, E. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.114B, p.97-101, 1996.
- GREENLEE, A.R.; BROWN, R.A.; RISTOW, S.S. Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptic mechanisms. *Dev. Comp. Immunol.*, v.15, p.153-164, 1991.
- GRINDE, B. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J. Fish Dis.*, v.12, p.95-104, 1989.
- GRINDE, B.; LIE, O.; POPPE, T.; SALTE, R. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture*, v.68, p.299-304, p.1988.

- HALVER, J.E. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Japn. Soc. Sci. Fish.*, v.38, n.1, p.79-81, 1972.
- HALVER, J.E. Recent advances in vitamin nutrition and metabolism in fish. In: COWEY, C.B.; MACKIE, A.M.; BELL, J.G. (Ed.). *Nutrition and Feeding in Fish*, London: Academic Press, 1985. p.415-429.
- HALVER, J.E.; ASHLEY, L.M.; SMITH, R.M., Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.98, p.762-771, 1969.
- HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, v. 95, p.201-214, 1991.
- HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, v.18, p.57-66, 1994.
- HENDERSON, R.J.; TOCHER, D.R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.*, v.26, p.281-347, 1987.
- HESSER, E.F. Methods for routine on fish hematology. *Progr. Fish Cult.*, v. 22, p.164-171, 1960.
- HIBIYA, T. *An atlas of fish histology: normal and pathological features*. Stuttgart: Gustav Fish Verlag., 1994. p.5-125.
- HIGGS, D.A.; DONG, F.M. Lipids and fatty acids. In: STICKNEY, R.R. *The Encyclopedia of Aquaculture*. New York: John Wiley and Sons, 2000. p.1-20.
- HILTON, J.W.; CHO, C.Y.; SLINGER, S.J. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets of rainbow trout. *J. Fish. Res. Board Can.*, v.35, p.431-436, 1978.
- HINE, P.M. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, v.2, p.79-88. 1992.
- HOSHINA, T. *Studies on red-fin disease of cel*. Tokyo: University of Fisheries, 1962. 105p. (Special Research Report, 6).
- HOUGH, J.S. *Bioteología de la cerveza y de malta*. Zaragoza: Acribia,1990. 194p.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, p.29, 2000.
- HUTCHINSON, T.H.; MANNING, J. Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, UK. *Fish Shellfish Immunol.*, v.6, p.473-482, 1996.
- HWANG, D.F.; LIN, T.K. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comp. Bioch. Physiol.*, v.131b, p.1-7, 2002.

- INGEBRIGTSEN, K.; HORSBERG, T.E.; DALMO, R.; SELJELID, R. Tissue distribution of the immunostimulator animated 1,3  $\beta$ -polyglucose in Atlantic salmon *Salmo salar* after intravenous, intraperitoneal and peroral administration. *Aquaculture*, v.117, p.29-35, 1993.
- INGLIS, V.; ROBERTS, R. J.; BROMAGE, N.R. *Bacterial diseases of fish*. Oxford: Blackwell Scientific, 1993. 312p.
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; NILSSEN, K.J. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, v.168, p.387-394, 1998.
- IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish Immune System. *Fish Physiol.*, v.15, 1996.
- JARAMILLO, J.F.; GATLIN, D.M. Comparison of purified and practical diets supplemented with or without  $\beta$ -glucan and selenium on resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis* to *Streptococcus iniae* infection. *J. World Aquacult. Soc.*, v.35, n.2, p.245-252, 2004.
- JAUNCEY, K.; SOLIMAN, A.; ROBERTS, R.J. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Aquaculture and Fish. Manag.*, v.16, p.139-149, 1985.
- 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.
- JOBLING, M. *Fish bioenergetics*. London: Chapman & Hall, 1994. 307p.
- JOHNSON, M.R.; AINSWORTH, A.J. An elevated dietary level of ascorbic acid fails to influence the response of anterior kidney neutrophils to *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *J. Aquatic Anim. Health*, v.3, p.266-273, 1991.
- JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast  $\beta$ -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, v.19, p.43-57, 1995.
- JOSHI, B.D. On some haematologic changes in *Heteropneustes fossilis*, following its sudden transfer to different temperatures. *Indian J. Zootomy*, v.22, n.2, p.117-122, 1981.
- KINKELIN, P.; MICHEL-DE, P.; GHITTINO, P. *Tratado de las enfermedades de los peces*. Zaragoza: Acribia, 1991. 353p.
- KIRON, V.; WATANABE, T.; FUKUDA, H.; OKAMOTO, N.; TAKEUCHI, T. Protein nutrition and defence mechanism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.3, p.351-359, 1995.
- KITABCHI, A.E. Ascorbic acid in steroidogenesis. *Nature*, v.215, p.1385-1386, 1967.

- KOPPENHEFFER, T.L. Serum complement system of ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.*, v.11, p.279-286, 1987.
- KWAK, J.K.; PARK, S.W.; KOO, J.G.; CHO, M.G.; BUCHHOLZ, R.; GOETZ, P. Enhancement of the non-specific defense activities in carp (*Cyprinus carpio*) and flounder (*Paralichthys olivaces*) by oral administration of Schizophyllan. *Acta Biotechnol.*, v.23, n.4, p.359-371, 2003.
- LAIDLEY, C.W.; WOO, P.T.K.; LEATHERLAND, J.F. The stress-response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobia salmositica* Kartz, 1951. *J. Fish Biol.*, v.32, p.253-261, 1988.
- LALL, S.P.; OLIVIER, G. Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish. In: INRA. *Fish Nutr.*, 1993. n.61.
- LALL, S.P.; OLIVIER, G.; WEERAKOON, D.E.M.; HINES, J.A. The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In: TAKEDA, M., WATANABE, T. International Symposium of Feeding and Nutrition in Fish, 3, 1990, Tokyo. Proceedings...Tokyo: Japan Translation Center, 1990. p.427-441.
- LANDOLT, M.L. The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture*, v.79, p.193-206, 1989.
- LEE, S.Y.; YIN, Z.; GE, R.; SIN, Y.M. Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for in vitro epithelial cell invasion. *J. Fish Dis.*, v.120, p.169-175, 1997.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Savier, 1995. 463p.
- LeMORVAN-ROCHER, C.; TROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Effect of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.*, v.19, p.87-95, 1995.
- LI, M.H.; LOVELL, R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.*, v.115, p.123-131, 1985.
- LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on tissue vitamin C concentration in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and clearance rate at two temperatures- A preliminary investigation. *J. Appl. Aquacult.*, v.4, p.59-71, 1994.
- LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. p.163-175.



- LI, M.H.; WISE, D.J.; ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.*, v.29, p.1-8, 1998.
- LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSDAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Org.*, v.6, p.1-5, 1989.
- LIM, C.; LOVELL, R.T. Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, v.108, p.1137-1146, 1978.
- LIM, C.; WEBSTER, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. 365p.
- LIM, C.; KLESIUS, P.H.; LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, v.185, p.313-327, 2000.
- LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P.H. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 1°. 2005, Botucatu. *Anais...Botucatu*, 2005. p.46-83.
- LIU, P.R.; PLUMB, J.A.; GUERIN, M.; LOVELL, R.T. Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Dis. Aquat. Org.*, v.7, p.191-194, 1989.
- LOCHMILLER, R.L.; WEICHMAN, J.D.; ZALE, A.V. Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.93A, n.3, p.535-541, 1989.
- LOPEZ, N.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.; VALENZUELA, M.; PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; ROSAS, C. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary  $\beta$  1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, v.224, p.223-243, 2003.
- LOVELL, R.T. *Nutrition and feeding of fish*. 2.ed. Massachusetts: Academic Press, 1998. 267p.
- MacARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C. Phagocytosis in Fish. In: MANNING, M., TATNER, M.F. *Fish Immunology*, London: Academic Press, 1985. p.29-46.
- MacMILLIAN, J. Infectious disease. In: TUCKER, C.S. *Channel Catfish Culture*. New York: Elsevier Science Publishers, 1985. p.434-441.
- MAGNADOTTIR, B. Comparison immunoglobulin (IgM) from four fish species. *Icel. Agric. Sci.*, v.12, p.47-59, 1998.

- MAGNADOTTIR, B.; GUOMUNDSDOTTIR, B.K. Comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.32, p.179-189, 1992.
- MAKI, P.A.; NEWBERNE, P.M. Dietary lipids and immune functions. *J. Nutr.*, v.122, p.610-614, 1992.
- MANNING, M.J. Fishes. In: TURNER (Ed.), *Immunology*. Chichester: John Wiley and Sons, p.69-100. 1994.
- MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L.  $\beta$ -glucans in edible mushrooms. *Food Chem.*, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.
- MARTINEZ, M.C.C. Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *Aquaculture*, v.86, p.409-419, 1990.
- MARTINS, M.L. *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em (Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887) estressados*. 2000. 125f. Doutorado (Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MATSUO, K.; MIYAZANO, I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkai Shi*, Tokyo, v.59, p.1377-1379, 1993.
- MATSUYAMA, H.; NAKAO, M.; YANO, T. Compatibilities of antibody and complement among different fish species. *Nippon Suisan Gakkai Shi*, v.54, p.1993-1996, 1988.
- MATSUYAMA, H.; MANGINDAAN, R.E.P.; YANO, T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, v.101, p.197-203, 1992.
- MAULE, A.G.; TRIPP, R.A.; KAATTARI, S.L.; SCHRECK, C.B. Stress alters immune function and disease resistance in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.*, v.120, p.135-42, 1989.
- McDANIEL, D. *American Fisheries Society: Fish Health Section*. Washington: Copyright, 1979, 118p.
- 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 acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*, Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p.119-144.

- MERCHIE, G.; LAVENS, P.; STORCH, V.; UBEL, U.; NELIS, H.; LEENHEER, A.D., SORGELOOS, P. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.114A, n.2, p.123-133, 1996.
- MILES, D.J.C.; POLCHANA, J.; LILLEY, J.H.; KANCHANAKHAN, S.; THOMPSON, K.D.; ADAMS, A. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, v.195, p.1-15, 2001.
- 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.
- MIYASAKI, T.; PLUMB, J.A.; LI, Y.P.; LOVELL, R.T. Histopathology of broken-back syndrome in channel catfish. *J. Fish Biol.*, v.26, p.647-655, 1995.
- MOCK, A.; PETERS, G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport, and water pollution. *J. Fish Biol.*, v.37, p.873-885, 1990.
- 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 (*Sparas aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, v.171, p.269-278, 1999.
- MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*, Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p.247-268.
- MOYNER, K.; ROED, K.H.; SEVATDAL, S.; HEUM, M. Changes in nonspecific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo sala* L., induced by *Aeromonas salmonicida* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, v.3, p.253-265, 1993.
- MURRAY, C.K.; FLETCHER, T.C. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *J. Fish Biol.*, v.9, p.329-334, 1976.
- MURRAY, A.; PASCHO, R.J.; ALCORN, S.W.; FAIRGRIEVE, W.T.; SHEARE, K.D.; ROLEY, D. Effects of various feed supplements containing fish protein hydrolysate or fish processing by-products on the innate immune functions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, v.220, p.643-653, 2003.

- NAGAE, M.; FUDA, H.; URA, K.; KAWAMURA, H.; ADACHI, S.; HARA, A.; YAMAUCHI, K. The effect of cortiso administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiol. Biochem.*, v.13, p.41-48, 1994.
- NARNAWARE, Y.; BAKER, B.I.; TOMLINSON, M.G. The effect of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.*, v.13, p.31-40, 1994.
- NAVARRE, O.; HALVER, J.E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, v.79, p.207-221, 1989.
- NIKL, L.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T.P.T. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, v.12, p.7-12, 1991.
- NITZAN, S.; ANGEONI, H.; GUR, N. Effects of ascorbic acid polyphosphate (AAPP) enrichment on growth, survival and disease resístanse of hybrid tilapia. *The Israeli J. Aquacult.*, v.48, p.133-141, 1996.
- NOGA, E.J. Diagnoses made by affected organs. In: - *Fish diseases: diagnosis and treatment*, Ames: Iowa State University, 2000. p.139-162.
- NONAKA, M.; YAMAGUCHI, N.; NATSUUME-SAKAI, S.; TAKAHASHI, M. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement. *J. Immunol.*, v.126, p.1489-1494, 1981.
- OLIVER, G.; EATON, C.A.; CAMPBELL, N. Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.12, p.223-234, 1986.
- OLLA, B.L.; DAVIS, M.W.; SCHRECK, C.B. Temperature magnified post-capture mortality in adult sablefish after simulated trawling. *J. Fish Biol.*, v.53, p.743-751, 1998.
- OOHARA, I.; AKIYAMA, T.; AONO, H. Distribution and interorganic correlations of lysozyme activity in the juvenile bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacul.*, v.19, p.17-26, 1991.
- ORTUNO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. High dietary intake of  $\alpha$ -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, v. 10, p.293-307, 2000.

- ORTUNO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, v.12, p.1-12, 2002.
- OURTH, D.D. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin and mucus of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Dev. Comp. Immunol.*, v.4, p.65-74, 1980.
- OURTH, D.D.; WILSON, E.A. Alternate pathway of complement and bactericidal response of the channel catfish to *Salmonella paratyphi*. *Dev. Comp. Immunol.*, v.6, p.75-85, 1982.
- OURTH, D.D.; BACHINSKI, L.M. Bactericidal sialic acid modulates activation of the alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.*, v.11, p.551-564, 1987.
- PANUSHI, R.S.; DELAFUENTE, J.C. Vitamins and immunocompetence. *World Rev. Nutr. Diet*, v.45, p.97-123, 1985.
- PASTOR, E.Z.; FRANCO, A.S. *Principales enfermedades infecciosas de los peces*. Barcelona: Biblioteca Tecnica Aedos, 1981.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO R.M. *Doenças de peixes: profilaxia, manejo e tratamento*. 2.ed. Maringá: EDUEM, 2002. 246p.
- PELETEIRO, M.C.; RICHARDS, R.H. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, v.8, p.161-172, 1985.
- PETRIC, M.C. *Efeito da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus, (Piaractus mesopotamicus, Holmberg, 1887)*. 2000. 86f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004. p.74-169.
- PICKERING, A.D. Introduction: the concept of biological stress. In: PICKERING, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p.1-9.
- PICKERING, A.D. Stress responses and disease resistance in farmed fish. In: Aqua Nor, 87, conference 3: *Fish Disease – a threat to international fish farming industry*. Trondheim : Norske Fiskeoppdretteres Forening, 1987. p.35-49.

- PICKERING, A.D.; DUSTON, J. Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L. and its effects on the susceptibility to *Saprolegnia* infection and furunculosis. *J. Fish Biol.*, v.21, p.163-175, 1983.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta*, to disease without reducing the white blood cell count. *J. Fish Biol.*, v.27, p.611-619, 1985.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CHRISTIE, P. Recovery of the brown trout *Salmo trutta* L. from acute handling stress: A time-course study. *J. Fish Biol.*, v.24, p.731-740, 1982.
- PILARSKI, F. *Imunização de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) com antígeno obtido de Flavobacterium columnare e suplementação alimentar com vitamina C*. 2006. 118f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- PLUMB, J.A. *Health maintenance of cultured fish*. Principal microbial diseases. Boca Raton: CRC, 1994. 254p.
- PLYZYCZ, B.; FLORY, C.M.; GALVAN, I.; BAYNE, C.J. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Dev. Comp. Immunol.*, v.13, p.217-224. 1989.
- POST, G. *Textbook of fish health*. New York: T.F.H. Publications, 1987. 288p.
- RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v. 4, n.3, p.229-288, 1996.
- RAA, J.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASINGLE, R.P.; ARTHUR, J.R. *Disease in Asian Aquaculture I*. Manila: Asian Fisheries Society, 1992. p.39-50.
- RALL, V.L.M.; ARIA, S.T.; HEIDTMANN, S. *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp.): Virulence factors and drug susceptibility. *Rev. Microbiol.*, v.29, p.222-227, 1998.
- RAMAKRISHNA, N.R.; BURT, M.D.B.; MacKINNON, B.M. Cell-mediated immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea) following sensitization to live sealworm, sealworm extract, and nonhomologous extracts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.50, p.60-65. 1993.

- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; EIRAS, A.C.; SILVEIRA, V.R. Effects of experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.46, p. 945-953, 2004.
- RASHEED, V.M. Diseases of cultured brown spotted grouper *Epinephelus tauvina* and silvery black porgy *Acanthopagrus cuvieri* in Kuwait. *J. Aquatic Animal Health*, v.1, p.101-107, 1989.
- RAZQUIN, B.E.; CASTILLO, A.; LÓPEZ-FIERRO, P.; ÁLVAREZ, F.; ZAPATA, A.; VILLENA, A.J. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.*, v.36, p.159-173, 1990.
- REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F. Stress physiology. *Fish Dis. Dis.*, v.2, p.279-301, 1998.
- RICHARDS, R.H.; ROBERTS, R.J. The bacteriology of teleosts. In: ROBERTS, R.J. *Fish pathology*. London: Baillien Tindall, 1978. Cap.8, p.183-204.
- ROBERTS, M.L.; DAVIS, S.J.; PULSFORD, A.L. The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.5, n.1, p.27-38, 1995.
- ROBERTS, R.J. The immunology of Teleost. In: - *Fish Patology*. London: Bailliere Tindall, 1989. p.135-150.
- ROBERTS, R.T. Motile Aeromonad Septicaemia. In: INGLIS, V., ROBERTS, R.J., BROMAGE, N.R. *Bacterial diseases of fish*. Oxford: Blackwell Science, 1993. Cap.8, p.143-155.
- 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 cervisiae* cell wall. *J. Fish Dis.*, v.13, p.391-400, 1990.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.  $\beta$ -glucans as immunostimulants in fish. In: STOLEN, J.; FLETCHER, T.C. (Eds). *Modulators of fish immune responses*. Fair Haven: SOS Publications, 1994. p.83-99.
- ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C.R. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultures red drum (*Sciaenops Ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*, v.68, p.115-130, 1988.
- ROED, K.H.; FJALESTAD, K.; LARSEN, H.J.; MIDTHJEL, L. Genetic variation in haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Fish Biol.*, v.40, p.739-750, 1992.

- ROSE, A.H. Composition of the envelope layers of *Sacharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *J. Appl. Bacteriol.*, v.74, n.22, suppl., p.10S-118S, 1993.
- ROTLANT, J.; PAVLIDIS, M.; KENTOYRI, M.; ABAD, M.E.; TORT, L. Non-specific immune response in the red *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, v.156, p.279-290, 1997.
- 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 Immunol.*, v.11, p.683-95, 2001.
- SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish Shellfish Immunol.*, v.12, p.1-16, 2002.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, v.172, p.63-92, 1999.
- SANTARÉM, M.; NOVOA, B.; FIQUEIRAS, A. Effects of  $\beta$ -glucans on the non-specific immune responses of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Fish Shellfish Immunol.*, v.7, p.429-437, 1997.
- SATO, M.R.; YOSHINAKA, R.; YAMAMOTO, S. Necessity of ascorbic acid in the diet of carp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, v.44, p.1151-1156, 1978.
- SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; ABELLI, L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture*, v.172, p.3-28, 1999.
- SCHLOTTFELDT, H.T.; ALDERMAN, D.J.A. Practical guide for the fresh water fish farmer. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, v.15, n.4, p.134-157, 1995.
- SCHRECK, C.B. Stress and compensation in teleostean fishes: Response to social and physical factors. In: PICKERING, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p.295-321.
- SECOMBES, C.J. The Nonspecific Immune System: Cellular Defenses. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. *The Fish Immune System*. London: Academic Press, 1996. 63-105.
- SECOMBES, C.J.; FLECHER, T.C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.2, p.53-71, 1992.
- 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 Immunol.*, v.19, p.293-306, 2005.
- SELYE, H. Homeostasis and heterostasis. *Perspect. Biol. Méd.*, v.16, p.441-445, 1973.



- SHAMA, S.; BRANDAO, D.A.; VARGAS, A.C. Bactéria com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. *Ciênc. Rural*, v.30, n.2, p.293-298, 2000.
- SHANKS, C.A.; WIRKKULA, J.R.; ROHOVEC, J.S. Effects of vitamin C on coho salmon infected with erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS). In: Proc. 2nd Int. Symp. *Viruses Lower Vertebrates*, Oregon, 1991.
- SHELTON, E.; SMITH, M. The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin: a tetrameric macroglobulin. *J. Mol. Biol.*, v.54, p.615-617, 1970.
- SHIAU, S.Y.; JAN, F.L. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fish. Sci.*, v.58, p.671-675, 1992.
- SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; PLUMB, J.A. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Vet. Immunol. Immunopatho.*, v.58, p.181-190, 1997.
- SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; LIM, C. Immunity and Disease Resistance in Fish. In: LIM, C., WEBSTER, C.D. *Nutrition and Fish Health*. New York: Food Products Press, 2001. p.149-162.
- SOBHANA, K.S.; MOHAN, C.V.; SHANKAR, K.M. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, v.207, p.225-238, 2002.
- SOLIMAN, A. K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.*, v.25, p.269-78, 1994.
- SPALLHOLTZ, J.E.; BOYLAN, L.M.; LARSEN, H.S. Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.587, p.123-139, 1990.
- STUDNICKA, M.; SIWICKI, A.; RYKA, B. Lysozyme level in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bamidgeh*, v.38, p.22-25, 1986.
- SUAREZ, R.K.; MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can. J. Zool.*, v.65, p.1869-1882, 1988.
- SUNG, Y.L.; HSIEH, Y.T. Immunostimulation of tiger shrimp hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, v.1, n.3, p.201-209, 1994.
- SUZUKI, K. A light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rockfish and rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, v.50, p.1305-1315, 1984.

- SUZUKI, Y.; IIDA, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.2, p.149-160, 1992.
- SWANN, L.; WHITE, D.V.M. Diagnosis and treatment of “*Aeromonas hydrophila*” infection of fish. In: *A Guide to Approved Chemicals in Fish Production and Fishery Resource Management*, University of Arkansas Cooperative Extension Service, 1989.
- TALBOT, C. Some aspects of the biology of feeding and growth in fish. *Proc. Nutr. Soc.*, v.52, p.403-416, 1993.
- THOMAS, J.S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.891-989.
- TIZARD, I.R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. São Paulo: Roca, 2002. 532p.
- TOLBERT, B.M.; DOWNING, M.; CARLSON, R.W.; KNIGHT, M.K.; BAKER, E.M. Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.258, p.48-69, 1975.
- TORT, L.; PADROS, F.; ROTLANT, J.; CRESPO, S. Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish Shellfish Immunol.*, v.8, p.37-47, 1998.
- URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004. p.171-193.
- VAL, A.L.; OLIVEIRA, A.M.; FIORINI, M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Nutrição e estresse em peixes da Amazônia. In: SIMPÓSIO de NUTRIÇÃO e SAÚDE de PEIXES, 2005, Botucatu. *Anais...* Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FMVZ, Universidade Estadual Paulista, 2005, p.84-92.
- VALLEJO, A.N.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. In: FAISAL, M., HETRICK, F.M. (Ed.), *Ann. Rev. Fish Dis.*, v.2, p.73-89, 1992.
- VAN-WEERD, J.H.; KOMEN, J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.120, p.107-112, 1998.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquacult. Fish. Manag.*, v.25, p.21-36, 1994.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v.143, p.123-133, 1996.

- VERLHAC, V.; OBACH, J.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, v.8, p.409-424, 1998.
- VIJAYAN, M.M.; LEATHERLAND, J.F. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Can. J. Zool.*, v.67, p.2746-2750, 1989.
- VIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout. A study using the steroid analog RU486. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.96, p.75-84, 1994.
- VOLPATTI, D.; D'ANGELO, L.; JENEY, G.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P.; GALEOTTI, M. Non specific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *J. Appl. Ichthyol.*, v.14, p.201-206, 1998.
- WAAGBO, R.; GLETTE, J.; RAA-NILSEN, E.; SANDNES, K. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, v.12, p.61-73, 1993.
- WAHLI, T.; MEIER, W.; PFISTER, K. Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Trop.*, v.43, p.287-289, 1986.
- WAHLI, T.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; MEIR, W. Influence of combined vitamin C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Dis.*, v.21, p.127-137, 1998.
- WALTERS, G.R.; PLUMB, J.A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Biol.*, v.17, p.177-185, 1980.
- WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.*, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.
- WATTS, M.; MUNDAY, B.L.; BURKE, C.M. Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.*, n.8, v.79, p.570-574, 2001.
- WEDEMEYER, G. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.29, p.1247-1251, 1969.
- WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.A.; MCLEAY, D.J. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C.B., MOYLE, P.B. *Methods for fish biology*. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. p.451-489.

- WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, v.77, n.3, p.591-625, 1997.
- WILSON, R.P.; POE, W.E. Impaired collagen formation in the scorbutic catfish. *J. Nutr.*, v.103, p.1359-1364, 1973.
- WISHKOVSKY, A.; AVTALION, R.R. Induction of helper and suppressor functions in carp (*Cyprinus carpio*) and their possible implication in seasonal disease in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, v.2, p.83-91, 1982.
- WOO, P.T.K.; LEATHERLAND, J.F.; LEE, M.S. *Cryptobia salmositica*: cortisol increases the susceptibility of *Salmo gairdneri* Richardson to experimental cryptobiosis. *J. Fish Dis.*, v.10, p.75-83, 1987.
- YOSHINAGA, K.; OKAMOTO, N.; KURATA, O.; IKEDA, Y. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol.*, v.29, p.1-4, 1994.
- YOUSIF, A.N.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T.P.T. Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis. Aquat. Org.*, v.10, p.45-49, 1991.
- ZAPATA, A.G. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.*, v.3, p.55-65, 1979.
- ZAPATA, A.G. Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.*, v.5, p.685-690, 1981.
- ZAPATA, A.G.; COOPER, E.L. The immune system: Comparative Histophysiology. Cjinchester: John Wiley and Sons, 1990.
- ZAPATA, A.G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. *The fish immune system*. London: Academic Press, 1996. p.1-62.

## **CAPÍTULO II**

### **NÍVEL DE SUPLEMENTAÇÃO DE $\beta$ -GLUCANO E VITAMINA C EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO: DESEMPENHO PRODUTIVO E PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS**

## NÍVEL DE SUPLEMENTAÇÃO DE $\beta$ -GLUCANO E VITAMINA C EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO: DESEMPENHO PRODUTIVO E PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS

**Resumo:** O desenvolvimento da aqüicultura associado à intensificação dos sistemas de produção gerou interesse no uso de imunoestimulantes em dietas para peixes. Nesta pesquisa, avaliou-se o desempenho produtivo, respostas hematológicas e imunes (determinação de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas (28,0% PD/3000 kcal ED/kg) contendo níveis de  $\beta$ -glucano (0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) e vitamina C (400 e 600 mg/kg da dieta) distribuídos num esquema fatorial (4 x 2) mais um tratamento controle (ausente de  $\beta$ -glucano e suplementado com 125 mg/kg vit C), totalizando nove tratamentos. Após 60 dias foi avaliado o desempenho produtivo sendo utilizadas 252 tilápias ( $16,86 \pm 0,24$ g). Posteriormente, 108 peixes foram submetidos ao estímulo pelo frio (sete dias/14,0°C) e 108 submetidos ao desafio com *Aeromonas hydrophila* (concentração  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup>/15 dias), sendo avaliados os parâmetros hematológicos e imunológicos (determinação de intermediários reativos do oxigênio do nitrogênio) antes e após os desafios. Concluiu-se que a suplementação de  $\beta$ -glucano e vitamina C não influencia o desempenho produtivo da tilápia do Nilo; que a suplementação de 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta determina melhores respostas imunológicas frente ao estímulo pelo frio e desafio com *Aeromonas hydrophila* e que, níveis elevados de suplementação de  $\beta$ -glucano (0,4 e 0,8%) promovem redução dos parâmetros imunológicos avaliados, independente da suplementação de vitamina C.

Palavras chave: estresse, higidez, imunoestimulante, vitaminas

**LEVEL OF  $\beta$ -GLUCAN AND VITAMIN C SUPPLEMENTATION ON NILE  
TILAPIA DIETS: PRODUCTIVE PERFORMANCE AND  
PHYSIOPATHOLOGICAL PARAMETERS**

**Abstract:** The development of aquaculture associated to the intensification of production system determined the interest in immunostimulant in fish diets. Growth performance, hematological and immune responses of Nile tilapia were determined in this research. Fish were fed diets containing 28.0% and DP/3000 kcal DE/kg and supplemented with levels of  $\beta$ -glucan (0.1; 0.2; 0.4 e 0.8%) and vitamin C (400 e 600 mg/kg diet) distributed in a factorial design (4 x 2) plus a control treatment without  $\beta$ -glucan and supplemented with 125.0 mg vit C/diet). After 60 days, growth performance of 252 tilapia ( $16.86 \pm 0.24$ g), randomly distributed in 36 250L-aquaria were determined, then 108 fish were submitted to cold stress (seven days/18.0°C) and 108 were challenged with *Aeromonas hydrophila* (concentration of  $10^5$ UFCml<sup>-1</sup>/15 days). Hematological and immunological parameters (reactive oxygen and nitrogen intermediates) were determined before and after challenges. Therefore, it is concluded that  $\beta$ -glucan and vitamin C did not influence growth performance; 0.1% of  $\beta$ -glucan and 600.0 mg of vit C/kg diet determine better immunological response related to cold stress and *Aeromonas hydrophila* challenge and that high levels of  $\beta$ -glucan supplementation (0.4 and 0.8%) determine a reduction of parameters immunological evaluated, independent of vitamin C supplementation.

Key words: stress, health, immunostimulant, vitamins

## Introdução

A indústria aquícola, com o passar dos anos, vem aumentando o interesse no uso de imunostimulantes, tanto como adjuvantes para vacinas quanto para mitigar os efeitos secundários causados pelo estresse, inerente à condição intensiva de produção. O aumento da susceptibilidade dos peixes a doenças é decorrente da imunossupressão causada, principalmente, pelo manejo adotado e por fatores ambientais desfavoráveis (Burrells et al., 2001).

As doenças de peixes são fatores limitantes no desenvolvimento da produção, ocorrendo com maior frequência onde as bactérias, dentre os vários patógenos, constituam o grupo com maior potencial causador de prejuízos econômicos na aquicultura (Frerichs e Millar, 1993). Infecção por *Aeromonas hydrophila* é provavelmente a bacteriose mais comum em peixes de água doce (Noga, 2000) caracterizada como septicemia hemorrágica bacteriana, responsável por mortalidade em sistemas intensivos de produção (Austin e Austin, 1987; Lee et al., 1997).

Vários grupos de substâncias determinam imunostimulação em animais terrestres, mas apenas algumas se mostraram eficazes para peixes (Raa et al., 1992; Volpatti et al., 1998). Dentre estas, destacam-se aquelas naturais, como os extratos retirados da parede celular de leveduras, que incluem principalmente os  $\beta$ -glucanos (Engstad e Robertsen, 1993). A utilização de  $\beta$ -glucanos para algumas espécies de peixes melhorou a atividade do sistema imune não específico e aumentou a resistência contra certos patógenos (Nikl et al., 1991; Anderson, 1992; Robertsen et al., 1994; Sakai, 1999).

O objetivo da imunostimulação em peixes não é apenas promover maior eficiência da resposta imune para infecções contra agentes patogênicos, mas também reduzir o efeito imunossupressivo do estresse (Anderson, 1992). Em temperaturas abaixo do conforto térmico para a espécie, o sistema imune não específico possui maior relevância no mecanismo de defesa. Dessa maneira, a suplementação com imunostimulante pode compensar a supressão do sistema imune ativando diretamente os macrófagos (Raa, 1996).

A fagocitose é importante elemento de defesa contra microorganismos (Oliver et al., 1986), sendo que a inclusão de  $\beta$ -glucano na dieta eleva a atividade fagocítica, bem como a frequência respiratória das células (Castro et al., 2006). Entretanto, a resposta induzida pelo  $\beta$ -glucano é eficiente e rápida, podendo levar à exaustão do sistema imune em concentrações elevadas e por períodos prolongados (Gannam e Schrock, 2001).



Pesquisas têm demonstrado efeito sinérgico entre vitaminas e imunostimulantes em dietas para organismos aquáticos, promovendo redução dos efeitos do estresse. A vitamina C não é considerada estritamente um imunostimulante, porém fornece substratos e participa como cofator necessário para o bom funcionamento do sistema imune em situações de estresse. O efeito do estresse no sistema imune de peixes tem sido amplamente estudado segundo Barton e Iwama (1991), principalmente pela complexidade de atuação. O aumento do metabolismo durante situações de estresse gera a redistribuição e maior demanda por vitaminas (Lovell, 1998). Segundo Wedemeyer (1969) este aumento na exigência é especialmente indicado para a vitamina C.

A capacidade desta vitamina em melhorar a condição de saúde do peixe, influenciando o sistema imune e a resistência a doenças, quando suplementada em níveis acima da exigência para o máximo desempenho produtivo vem sendo amplamente reconhecida (Gatlin III, 2002). Entretanto, resultados desses estudos ainda são contraditórios (Liu et al., 1989; Navarre e Halver, 1989; Hardie et al., 1991; Waagbo et al., 1993).

A utilização de vitaminas e imunostimulantes em dietas para peixes vêm se tornando alternativa para minimizar os efeitos fisiológicos do estresse. Neste contexto, esta pesquisa teve por objetivo avaliar a ação da suplementação de níveis de  $\beta$ -glucano e vitamina C sobre a resistência orgânica dos peixes, frente a diferentes fatores de estresse, como estímulo pelo frio e desafio com *Aeromonas hydrophila* em juvenis tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

## **Material e Métodos**

Este estudo foi conduzido na Unesp – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, Câmpus de Botucatu, unidade integrada ao CAUNESP.

### *Formulação e confecção das rações*

As rações foram formuladas com base nos dados apresentados no NRC (1993) e nos valores de digestibilidade aparente de aminoácidos (Furuya et al., 2004) e disponibilidade de minerais de Pezzato et al. (2004). Foram confeccionadas nove dietas práticas isoaminoácídicas com 28,0% de proteína digestível e 3000 kcal de energia digestível/kg, às quais foram suplementados os aminoácidos lisina, metionina, triptofano e treonina.

O  $\beta$ -glucano e a vitamina C foram adicionados em substituição ao amido de milho. O percentual dos ingredientes e a composição químico-bromatológica das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 1.

O suplemento vitamínico e mineral adicionado era isento de ácido ascórbico, especialmente confeccionado para a pesquisa, sendo considerado como fonte deste somente o adicionado à dieta. A vitamina C utilizada foi L-ascorbato-2-monofosfato com 35,0% de atividade (Stay-C Roche<sup>®</sup>) e o  $\beta$ -glucano foi o GC-Goldcell<sup>®</sup> (85,0%) obtido a partir da parede celular da levedura *Saccharomices cerevisae*.

Para o preparo das dietas, os ingredientes foram moídos em partículas menores que 0,7 mm e homogeneizados em misturador automático. Essa mistura foi submetida ao processo de extrusão em equipamento de rosca simples (Extrutech<sup>®</sup>). As dietas foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 55,0°C, durante 24 horas. Os peletes foram fracionados para se adequar ao tamanho dos peixes e posteriormente armazenados a -20,0°C.

#### *Delineamento experimental e manejo alimentar*

Duzentos e cinquenta e duas tilápias do Nilo, revertidas sexualmente, com peso médio de  $16,86 \pm 0,24$ g foram distribuídas aleatoriamente em 36 aquários circulares, com volume de 250 litros cada, numa densidade de estocagem de sete peixes/aquário.

Para manutenção dos parâmetros físico-químicos da água, o sistema de abastecimento foi dotado de filtro mecânico e biológico, além de aquecimento controlado por termostato digital e aeração. A temperatura da água dos aquários foi mantida dentro da faixa de conforto para a espécie ( $25,0 \pm 2,0$ °C), aferida às 8h00 e 16h00. A medição do pH e do teor de oxigênio dissolvido na água foi efetuado semanalmente, por meio de peagômetro e oxímetro digitais, respectivamente.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado num esquema fatorial 4 x 2 com quatro níveis de suplementação de  $\beta$ -glucano (0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% da dieta) e dois níveis de suplementação de vitamina C (400,0 e 600,0 mg de ácido ascórbico/kg da dieta) mais um tratamento controle sem a adição de  $\beta$ -glucano e suplementado com 125,0 mg de ácido ascórbico/kg da dieta, totalizando nove tratamentos com quatro repetições.

Os peixes foram alimentados *ad libitum*, quatro vezes ao dia, 8h00, 12h00, 14h00 e 18h00 horas, numa proporção que possibilitou máxima ingestão sem perdas. A dieta foi armazenada em freezer e, semanalmente, os potes foram abastecidos com as respectivas

quantidades, minimizando as perdas de vitamina C. Quando necessário foi realizada a limpeza dos aquários, por sifonagem, para retirada de resíduos. Todos os peixes foram pesados no início e ao final do período experimental. Para tal, foi utilizada balança de precisão (0,01 g), sendo as pesagens antecedidas por 12 horas de jejum.

#### *Desempenho produtivo*

Após 60 dias experimentais foram avaliados os seguintes índices de desempenho produtivo: ganho de peso, conversão alimentar aparente, consumo aparente de dieta e porcentagem de sobrevivência.

#### *Análises hematológicas e bioquímicas*

Após o período para avaliação do desempenho produtivo (60 dias), foi realizado o hemograma. Para a determinação do perfil hematológico foram utilizados oito peixes por tratamento. Os mesmos foram anestesiados com benzocaína (1,0 g/15 L) e o sangue coletado com auxílio de seringa de 1,0 mL com anticoagulante (EDTA 3,0%), por meio da punção do vaso caudal. A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada pelo método do hemocítmetro em câmara de Neubauer, utilizando-se o azul de toluidina a 0,01% em pipeta de Thoma como solução diluente e corante.

A diferenciação dos leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas com May-Grünwald Giemsa. A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se “kit” de determinação fotocolorimétrica (Analisa Diagnóstica<sup>®</sup>). O hematócrito foi obtido utilizando-se centrífuga para microhematócrito em 5000 rpm durante cinco minutos. A proteína plasmática total foi determinada por meio de refratômetro manual de Goldenberg. A análise de albumina sérica foi efetuada utilizando-se “kit” de análise (Analisa Diagnóstica<sup>®</sup>) e as globulinas foram determinadas por cálculo diferencial. Após a determinação das concentrações de albumina e globulina foi calculada a relação albumina: globulina (A:G). As variáveis acima apresentadas foram avaliadas segundo as técnicas descritas por Jain (1986).

As análises de cortisol plasmático foram realizadas na Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução, Câmpus de Botucatu pelo método radioimunoensaio utilizando-se kit DPC – Diagnostic Products Corporation<sup>®</sup> (coat-a-count,

fase sólida).

*Parâmetros imunológicos (intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio)*

Para a determinação dos intermediários reativos do oxigênio (IRO) e do nitrogênio (IRN), o sangue foi coletado de seis peixes de cada tratamento conforme procedimento descrito para as análises hematológicas. Após a coleta do sangue, o mesmo foi colocado em tubos ependorfe (1,5 mL) e levados para câmara asséptica de fluxo laminar, modelo PCR 2.5 – Pachane<sup>®</sup>. Posteriormente, o sangue foi transferido, com auxílio de pipetador automático, para tubos Falcon estéreis contendo 7,0 mL de meio completo para cultura de células (meio Leibowitz L-15 suplementado com 2,0% de soro bovino fetal, 2,0 mM de glutamina e gentamicina) e homogeneizado, sendo os tubos mantidos em banho de gelo. Em outro tubo Falcon foram colocados, lentamente pela parede do tubo, 3,0 mL de Percoll 51,0 e 34,0%, respectivamente. O sangue foi então transferido lentamente para o gradiente de percoll, sendo, em seguida, centrifugado a 1200 rpm, por 20 minutos, a 10,0° C.

Decorrido este período, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 15,0 mL de L-15, sendo centrifugado a 1000 rpm, por 10 minutos, a 10,0°C. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. Em seguida, as células foram ressuspensas para 1,0 mL de meio L-15 contendo 0,1% de soro bovino fetal, sendo a concentração ajustada para  $2,0 \times 10^6$  células/mL.

Alíquotas de 100 µL destas suspensões foram distribuídas em placas de microcultura, com posterior incubação (18,0°C). Decorridas duas horas, as células não-aderentes foram removidas e a monocamada de leucócitos incubada (18,0°C) por 24 horas, com a presença ou não de PMA (phorbol miristate acetate). O protocolo adotado foi adaptado de Secombes (1990).

A produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por leucócitos sanguíneos de *Oreochromius niloticus* foi determinada por meio da microtécnica de oxidação do vermelho fenol (Pick e Mizel, 1981). Após a incubação das culturas celulares por 24 horas, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de óxido nítrico e as células utilizadas para a determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As células foram ressuspensas ao volume original (100 µL) em solução vermelho fenol, contendo 140,0 mM de NaCl, 10,0 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0; 5,5 mM de dextrose de raiz forte tipo II (0,01 mg/mL). As culturas foram novamente incubadas em estufa a 18,0°C, por 120 minutos. Após este período, a reação foi

interrompida pela adição de 10,0 µL de NaOH 1N.

A absorvância foi determinada em microleitor de Elisa automático, com filtro de 620 nM, sendo o branco constituído de vermelho fenol e NaOH. Os resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2,0x10<sup>5</sup> células, a partir da curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão vermelho fenol.

A produção de NO por leucócitos sanguíneos da tilápia do Nilo foi determinada por método colorimétrico, baseado na reação de Griess (Green et al., 1981), combinando 100 µL do sobrenadante da amostra teste com 100,0 µL do reagente Griess (Need 0,1% e sulfanilamida 1,0% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5,0%).

As leituras foram efetuadas em microleitor de Elisa, utilizando filtro de 540nm. Os resultados foram expressos em µmoles de NO/2,0x10<sup>5</sup> células, comparando-se a densidade óptica com a curva padrão de NO<sub>2</sub>, realizada em cada experimento.

#### *Análises de vitamina C*

A determinação da concentração de vitamina C no fígado foi feita pelo método HPLC fase reversa (Wang et al., 1988) na Unesp – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Laboratório de Química, Câmpus de Jaboticabal. Para tal, três peixes por tratamento foram sacrificados, os fígados retirados e mantidos congelados a -80,0°C para posterior análise. As análises de vitamina C da dieta foram realizadas no Laboratório de Alta Tecnologia – Labtec – Campinas/SP.

Após as análises, hematológicas e imunológicas, os peixes restantes foram divididos em dois grupos com 108 peixes cada e submetidos a dois tipos de estresse para a avaliação do estado fisiológico. Um grupo foi submetido ao estresse pelo frio e o outro ao desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

#### *Estímulo pelo frio*

Após o término do desempenho produtivo e das análises realizadas nesta etapa, os peixes utilizados nesse experimento foram mantidos na mesma estrutura experimental do desempenho produtivo por dois dias, para a redução gradativa da temperatura da água (25,0 ± 2,0°C), até igualarem à temperatura da água dos aquários da sala de estímulo pelo frio

(20,0°C). Este procedimento evitou o choque térmico quando da transferência dos peixes. Para a realização desse desafio foi mantido o mesmo delineamento experimental do desempenho produtivo, sendo que 108 peixes foram transferidos para a sala experimental contendo 27 aquários de 40,0 litros cada (com filtros e aeração individualizados), na densidade de quatro peixes por aquário, perfazendo três repetições por tratamento.

Posteriormente à transferência dos peixes, efetuou-se a redução da temperatura da água dos aquários de 20,0°C para 14,0°C (com redução de 2,0°C por dia), tendo os peixes permanecidos nessas condições por sete dias. Após esse período, foram avaliados os mesmos parâmetros hematológicos e imunológicos (IRO e IRN) do desempenho produtivo e, a determinação da concentração de vitamina C no fígado.

#### *Desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila**

A cepa de bactéria utilizada foi fornecida pelo Laboratório de Patologia de Peixes, CAUNESP, Câmpus de Jaboticabal. A viabilidade e pureza da bactéria foram confirmadas na Unesp – Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Câmpus de Botucatu.

Para a determinação do inóculo a ser utilizado no desafio experimental, três grupos de 25 peixes cada foram infectados com diferentes concentrações de *A. hydrophila* ( $10^4$ ;  $10^6$  e  $10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>) visando a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes testados (DL<sub>50</sub>), de acordo com metodologia proposta por Plumb e Bowser (1983). Essa avaliação foi efetuada 20 dias antes da finalização do período para avaliação do desempenho produtivo.

Determinada a DL<sub>50</sub> e após finalização do desempenho produtivo, 108 peixes foram inoculados com *A. hydrophila* por meio de inoculação intraperitoneal com a concentração determinada do agente patógeno ( $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>) contido em 0,1 mL de solução salina (0,85%). Os peixes de todos os tratamentos receberam também uma injeção de dexametasona (0,04mL/100g peso vivo) visando diminuir a resistência dos animais e a facilitação da ação da bactéria. A avaliação da mortalidade foi efetuada duas vezes ao dia, juntamente com a alimentação. Ao final de 15 dias foi determinado o perfil hematológico, a produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio e a taxa de sobrevivência.

### *Análise estatística*

Os resultados desse estudo foram avaliados por meio da técnica da análise de variância multivariada considerando os perfis médios de resposta e quando significativo, foi complementado com os intervalos dos contrastes de médias por Hotelling (Johnson e Wichern, 1998), para comparação dos momentos anterior e posterior ao desafio. A análise incluiu também o contraste do tratamento controle com os demais tratamentos, por meio do teste de Scheffé. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do pacote computacional SAS, ao nível de 5,0% de significância.

## **Resultados**

### *Desempenho produtivo*

A suplementação de  $\beta$ -glucano e vitamina C na dieta não influenciou o ganho de peso, consumo aparente da dieta e a conversão alimentar aparente dos peixes após 60 dias de alimentação. Essa mesma resposta foi determinada quando do contraste do tratamento controle com os demais tratamentos suplementados (Tabela 2).

A não significância observada para os parâmetros de desempenho produtivo foi também verificada para os parâmetros hematológicos e imunológicos avaliados nos peixes arraçoados com as dietas suplementadas com níveis de  $\beta$ -glucano e vitamina C na dieta e quando comparados com o tratamento controle na fase anterior ao estímulo pelo frio e anterior ao desafio com *Aeromonas hydrophila* (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

### *Estímulo pelo frio*

Posteriormente ao estímulo pelo frio, quando comparou-se os peixes dos tratamentos suplementados com  $\beta$ -glucano e vitamina C na dieta, estes não apresentaram diferença significativa entre si, assim como quando comparados com os do tratamento controle para os parâmetros hematológicos, com exceção para o volume corpuscular médio (VCM), sendo que a suplementação com maior nível de  $\beta$ -glucano, independente do nível de vitamina C, apresentou maior VCM (Tabela 4). Observou-se diferença significativa para todos os tratamentos quando se compararam os momentos, antes e após o estímulo pelo frio, para

número de eritrócitos e porcentagem de hematócrito, com redução dos valores de ambos os parâmetros após o estímulo (Tabela 3).

Observou-se efeito significativo do  $\beta$ -glucano para proteína plasmática total (PPT), com diminuição à medida que houve aumento no nível de suplementação e quando da comparação entre os peixes dos tratamentos que receberam dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano e vitamina C em relação aos peixes do tratamento controle. Em relação aos momentos inicial e final do estímulo pelo frio, todos os tratamentos apresentaram efeito significativo com diminuição da PPT no momento final (Tabela 4).

O nível de suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta determinou aumento ( $P < 0,05$ ) da relação albumina:globulina (A:G). Embora a suplementação de vitamina C não tenha apresentado efeito significativo, observou-se tendência inversa dessa relação à medida que ocorreu aumento da suplementação de vitamina C na dieta. Comparando-se os valores obtidos nos peixes alimentados com a dieta controle com os que receberam dieta suplementada, observou-se maior valor desta relação ( $P < 0,05$ ) no tratamento controle. A não suplementação de  $\beta$ -glucano (tratamento controle), juntamente com a suplementação de 0,1 e 0,2% na dieta, independente do nível de vitamina C, determinou igualmente diferença ( $P < 0,05$ ) nos momentos para a relação A:G. Porém, a presença de  $\beta$ -glucano na dieta determinou valores menores que a ausência (Tabela 4).

O estímulo pelo frio determinou leucopenia, linfopenia e neutrofilia nos peixes alimentados com a dieta controle (Tabela 5). A vitamina C também determinou aumento da porcentagem de neutrófilos após o estímulo pelo frio, fato este igualmente observado se considerado o número absoluto dessas células [(n° total de leucócitos x porcentagem da célula)/100], sendo que a suplementação de  $\beta$ -glucano determinou linfocitose e neutrofilia com o incremento da suplementação, igualmente após o estímulo pelo frio. Houve ainda interação significativa para a porcentagem de neutrófilo, com aumento da mesma à medida que diminuiu o nível de suplementação de  $\beta$ -glucano e aumentou o de vitamina C na dieta. Novamente, esses resultados foram evidenciados em relação ao número absoluto de células.

Em relação aos parâmetros imunes avaliados, intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio produzidos por leucócitos sanguíneos (Tabela 6), verificou-se apenas diferença significativa nos peixes dos tratamentos suplementados em relação aos peixes do tratamento controle tanto para  $H_2O_2$  como para NO, com diminuição destes nos peixes que receberam a dieta controle. Porém, verificou-se tendência de diminuição na produção de intermediário reativo do oxigênio à medida que ocorreu aumento do nível de  $\beta$ -glucano na dieta, tendo os peixes do tratamento com maior suplementação de  $\beta$ -glucano valores de intermediário reativo



do oxigênio próximos aos do tratamento controle. Pode-se observar efeito significativo do momento em todos os tratamentos para este parâmetro, tendo o estresse pelo frio causado supressão na produção de intermediário reativo do oxigênio. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre momentos para intermediário reativo do nitrogênio (com exceção do tratamento controle), observou-se, também, tendência de redução nos valores desse parâmetro após o estímulo pelo frio.

Verificou-se diferença significativa do cortisol plasmático dos peixes dos tratamentos suplementados em relação aos peixes do tratamento controle, sendo que este tratamento determinou maior concentração de cortisol plasmático, bem como, diferença entre momentos. Houve diferença significativa para a concentração de vitamina C no fígado dos peixes do tratamento controle em relação aos peixes dos tratamentos suplementados, tanto antes como após o estímulo pelo frio. Houve ainda, efeito da concentração de vitamina C, com aumento da concentração dessa vitamina no fígado à medida que aumentou a suplementação na dieta (Tabela 7).

#### *Desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila**

Não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) no perfil hematológico e nos valores hematimétricos, antes e após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Porém, comparando-se os momentos, houve prejuízo na eritropoiese nos peixes de todos os tratamentos e na porcentagem do hematócrito para os peixes do tratamento controle (Tabela 3).

Os níveis de  $\beta$ -glucano e vitamina C não influenciaram a concentração de proteína plasmática total, porém houve maior relação A:G ( $P < 0,05$ ) nos peixes do tratamento controle quando comparados com os peixes alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano e vitamina C, bem como, efeito ( $P < 0,05$ ) do  $\beta$ -glucano, com aumento diretamente proporcional da relação A:G com o incremento da suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta. Quando da avaliação dos momentos, observou-se diferença significativa para os três primeiros níveis de suplementação de  $\beta$ -glucano (0,1; 0,2 e 0,4%), independentemente do nível de suplementação da vitamina C (Tabela 4).

A infecção com *Aeromonas hydrophila* determinou leucopenia acompanhada de neutrofilia e monocitose nos peixes alimentados com a dieta controle ( $P < 0,05$ ). Houve interação significativa demonstrando ser, a produção de neutrófilo após o desafio com bactéria, dependente dos níveis de  $\beta$ -glucano e vitamina C. Comparando-se os momentos, observou-se leucopenia nos peixes alimentados com a dieta controle e nos peixes que

receberam dietas suplementadas com 0,4 e 0,8% de  $\beta$ -glucano, independente do nível de vitamina C. Linfopenia e neutrofilia foram observadas nos peixes alimentados com as dietas suplementadas com 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano, igualmente independente do nível de vitamina C e, monocitose nos peixes arraçoados com as dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano e vitamina C. Resultados esses, observados quando se considerou o número absoluto de células (Tabela 5).

Para os parâmetros imunes avaliados (IRO e IRN) verificou-se que a suplementação de  $\beta$ -glucano influenciou ( $P < 0,05$ ) a produção de intermediário reativo do oxigênio e nitrogênio após o desafio com a bactéria e, que houve declínio na produção dos intermediários reativos com o aumento da suplementação do imunestimulante, assim como diferença ( $P < 0,05$ ) dos peixes do tratamento controle em relação aos peixes dos tratamentos suplementados após o desafio. Comparando-se os momentos, a suplementação com 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano independente do nível de suplementação de vitamina C, observou-se maior produção de intermediário reativo do oxigênio (Tabela 6).

Durante o desafio com *Aeromonas hydrophila* foi quantificada a mortalidade cumulativa (Tabela 8). Observou-se que a menor porcentagem de sobrevivência ocorreu nos peixes do tratamento controle e, nos peixes dos tratamentos suplementados com as maiores porcentagens de  $\beta$ -glucano na dieta, 0,4 e 0,8%, respectivamente. Foram observados, nos peixes, de todos os tratamentos, sinais clínicos, tais como: apatia, hemorragia ao longo do corpo, úlceras com exposição da musculatura e exsudato peritonial.

## Discussão

O efeito da suplementação de  $\beta$ -glucano em dietas por períodos prolongados tem recebido pouca atenção. Na maioria dos casos, a avaliação se baseia predominantemente em períodos curtos e/ou em situações de estresse agudo, sendo os peixes desafiados principalmente por bactérias e por ações de manejo. Nestas pesquisas, as avaliações se baseiam sobretudo na resposta imune, sendo pouco avaliado o desempenho produtivo e o efeito da temperatura (Cook et al., 2003; Whittington et al., 2005).

Neste estudo, a suplementação de  $\beta$ -glucano e vitamina C, durante 60 dias, não influenciou o desempenho produtivo dos peixes. Respostas semelhantes foram anteriormente descritas para truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, alimentadas com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano e vitamina C (Efthimiou, 1996), para *Dentex dentex* utilizando-se diferentes

preparados de  $\beta$ -glucano na dieta (Verlhac et al., 1998) e para *Dicentrarchus labrax* com suplementação de níveis de  $\beta$ -glucano na dieta (Bagni et al., 2005). Igualmente, a não influência da vitamina C no ganho de peso foi descrita para salmão do Atlântico, *Salmo salar*, dourada, *Sparus aurata* e para *Pseudosciaena crocea* (Thompson et al., 1993; Henrique et al., 2002; Ai et al., 2006).

Entretanto, resultados da ação do  $\beta$ -glucano administrado via dieta e por períodos prolongados ainda são conflitantes em relação ao desempenho produtivo. Respostas positivas foram descritas por Misra et al. (2006) para carpa indiana, *Labeo rohita*, independentemente do nível suplementado e por Cook et al. (2003) para *Pagrus auratus*, em condições de baixa temperatura (inverno). Porém, neste mesmo estudo, em condições adequadas de temperatura (verão), não houve influência no ganho de peso e conversão alimentar aparente para *Pagrus auratus* (Cook op. cit.) e para *Dicentrarchus labrax* (Bagni et al., 2005). Estes autores ressaltaram a melhora do desempenho produtivo com a utilização do  $\beta$ -glucano em condições de inverno.

Desta forma, o possível efeito da suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta sobre o desempenho produtivo, em situações adversas, provavelmente esteja relacionado ao aumento da resposta do sistema imunológico e à manutenção do equilíbrio orgânico do peixe, possibilitando dessa maneira maior consumo da dieta com conseqüente aumento no ganho de peso. A ausência de efeito significativo sobre o desempenho produtivo observado neste estudo, provavelmente esteja relacionada à temperatura de conforto mantida na fase que antecedeu os desafios.

Essa condição adequada refletiu também no perfil hematológico dos peixes. Os valores anteriores às condições do estímulo pelo frio e desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila* se encontraram dentro da faixa considerada ideal para peixes hígidos (Feldman et al., 2000). Esses resultados corroboram com os obtidos por Barros et al. (2002) e Barros et al. (2004), em condições experimentais semelhantes. Entretanto, tanto a baixa temperatura, bem como a infecção por bactéria foram nocivos à eritropoiese, retratando a ação dos desafios.

O prejuízo na síntese de células sanguíneas foi igualmente descrito por Harikrishnan et al. (2003) para a carpa comum, *Cyprinus carpio*, infectadas com *Aeromonas hydrophila*. Ainda que os momentos tenham determinado diferenças nos parâmetros sanguíneos, a suplementação de  $\beta$ -glucano e de vitamina C na dieta, nas diferentes concentrações, não foi capaz de manter a eritropoiese nos padrões considerados adequados para animais sadios (Feldman et al., 2000; Barros et al., 2006).

Tanto nas condições do estímulo pelo frio e desafio por bactéria os peixes encontravam-se com a capacidade de transporte de oxigênio prejudicada, confirmando novamente a ação dos desafios. Semelhantemente, Alves de Andrade et al. (2006) não observaram manutenção da qualidade dos parâmetros hematológicos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, após infecção por *Aeromonas hydrophila* quando alimentados com dietas suplementadas com vitamina C. Neste estudo, a suplementação de 0,8% de  $\beta$ -glucano na dieta determinou, nas condições do estímulo pelo frio, a liberação de células sanguíneas imaturas. Isto pode retratar ainda efeito nocivo da quantidade utilizada de  $\beta$ -glucano.

Os desafios aos quais os peixes foram submetidos causaram ainda queda na PPT, entretanto, a severidade do estímulo pelo frio foi mais representativa, como relatado por Hrubec et al. (2000). Porém, neste estudo, a suplementação de  $\beta$ -glucano e vitamina C na dieta aumentou a resposta ao estresse, por meio do aumento da PPT e da diminuição da A:G, caracterizada pelo aumento da produção de globulinas, em relação aos peixes do tratamento controle. Thomas (2000) destacou que em casos de estresse e inflamação, ocorreu aumento na produção de globulinas, alterando a concentração de proteína plasmática total. Igualmente, Sahoo e Mukherjee (2001) destacaram a importância do aumento de globulinas no soro para o mecanismo de defesa, com conseqüente redução da A:G, em peixes alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano.

Ressalta-se ainda que, neste estudo, independentemente do desafio avaliado, a ausência e a suplementação com o maior nível de  $\beta$ -glucano na dieta, proporcionaram diminuição da resistência orgânica dos peixes em relação aos demais níveis de suplementação, o primeiro pela ausência do imunoestimulante e o segundo pela diminuição na produção de globulinas. Igualmente, Misra et al. (2006) relataram aumento da porcentagem de globulina em carpas indianas alimentadas com dietas contendo  $\beta$ -glucano.

O aumento da susceptibilidade dos peixes a doenças é decorrente da imunossupressão causada pelo estresse. A variação da temperatura da água, principalmente durante épocas de inverno, é considerada uns dos principais fatores estressores aos peixes. Como conseqüência, pode-se relatar ainda o aumento da suscetibilidade a patógenos oportunistas. O leucograma dos peixes neste estudo, após o estímulo pelo frio e o desafio por bactéria, suporta esta hipótese.

A leucopenia, observada nos peixes desta pesquisa, após o estímulo pelo frio e o desafio por bactéria, foi anteriormente reportada por Barton e Iwana (1991). Estes autores ressaltaram ainda que, em condições de estresse, esta queda na produção total de células

brancas foi acompanhada por linfopenia. Este quadro foi também observado neste estudo, ainda com aumento na produção de neutrófilos e monócitos. Em situações de estresse, a liberação de catecolaminas e cortisol causa constrição esplênica, aumento do fluxo sanguíneo e migração dos leucócitos e, ainda, diminuição do número de células brancas totais e de linfócitos, juntamente com prejuízo nas funções fagocitárias das células (Barton e Iwana, 1991; McDonald e Milligan, 1992). Segundo Pickering e Pottinger (1985), a redução do número de linfócitos circulantes pode representar importante ligação entre a resposta ao estresse e o surgimento de doenças devido a elevação do nível plasmático de cortisol. Igualmente, Pickering (1986) relatou que a queda de linfócitos pode estar relacionada com a capacidade do peixe de se defender contra agentes patógenos.

Avaliando-se os nutrientes testes individualmente, observou-se que, embora o incremento na suplementação de  $\beta$ -glucano tenha determinado aumento do número de linfócitos, tanto nos peixes submetidos ao estímulo pelo frio quanto os infectados pela bactéria, houve queda na produção de neutrófilos e monócitos, com menor produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio. A produção de neutrófilos mostrou-se dependente tanto da suplementação de  $\beta$ -glucano, como de vitamina C. Este quadro de alteração da condição de saúde pode ser também resultado da liberação do cortisol e ou efeito nocivo da quantidade de imunostimulante suplementada.

A avaliação do leucograma mostrou que após o estímulo pelo frio e o desafio por bactéria ocorreu maior produção de células fagocíticas, relacionadas à eliminação de microorganismos invasores, predominantemente nos peixes alimentados com as dietas suplementadas com níveis inferiores de  $\beta$ -glucano, tais como, neutrófilos e monócitos.

Os valores de cortisol observados nesta pesquisa e considerados dentro da faixa para peixes não estressados (Barton e Iwana, 1991) não excluem a possibilidade deste hormônio ter sido liberado e ter ainda influenciado as respostas fisiológicas dos peixes. A linfopenia e a neutrofilia associadas a situações de estresse por baixa temperatura e por infecções bacterianas e virais e, ainda, por estresse cumulativo foram descritas por Brenden e Huizinga (1986); Plyzycz et al. (1989); Englesma (2002) e Martins et al. (2004).

Semelhantemente ao observado no eritrograma, o estímulo pelo frio desencadeou redução na contagem total de leucócitos e na contagem diferencial, nos peixes dos tratamentos suplementados com a maior porcentagem de  $\beta$ -glucano em relação aos demais tratamentos. Este fato, talvez possa ser explicado pelo efeito nocivo da alta quantidade de imunostimulante. Igualmente, no desafio por bactéria esta redução esteve pronunciada nos

peixes alimentados com as dietas suplementadas com maiores concentrações de  $\beta$ -glucano. Pesquisas têm demonstrado que níveis elevados de  $\beta$ -glucano na dieta podem proporcionar imunossupressão nos peixes. Jeney et al. (1997) observaram linfocitose, neutropenia e monocitopenia em peixes alimentados com dietas suplementadas com 1,0% de  $\beta$ -glucano, sendo que valores menores de suplementação não determinaram queda na produção de células de defesa após estresse por transporte.

A influência da suplementação de vitamina C na contagem de neutrófilos sanguíneos após os desafios, parece estar diretamente relacionada com o aumento da atividade dessas células nos peixes dos tratamentos que não apresentaram imunossupressão. Exceção apenas em relação ao estímulo pelo frio, nos peixes dos tratamentos que receberam suplementação com 0,4% de  $\beta$ -glucano na dieta devido, provavelmente, ao elevado desvio-padrão.

Os leucócitos são capazes de armazenar grandes quantidades de ácido ascórbico. Esta capacidade pode estar relacionada às exigências por substâncias antioxidantes com o intuito de manter a integridade das membranas e o adequado funcionamento das células imunes (Sobhana et al., 2002), pois peróxidos e radicais livres são produzidos por estas células com o objetivo de destruir os patógenos fagocitados. Porém, a superprodução destes pode ser letal para a própria célula (Fracalossi et al., 1998). Esta hipótese pode explicar o efeito da vitamina sobre os neutrófilos.

A concentração de vitamina C no fígado dos peixes foi representativa, alterando seu valor de acordo com o nível de suplementação. Resultado semelhante foi também relatado para o bagre do canal por El Naggar e Lovell (1991). A suplementação desta vitamina, em níveis acima do recomendado, propiciou reserva necessária para promover sua redistribuição e utilização pelo organismo quando do estímulo pelo frio. A necessidade desta reserva com melhora das respostas fisiológicas contra estresse e infecções foi anteriormente descrita por Lim et al. (2001) e Norrgren et al. (2001). Li e Robinson (1994) concluíram que a concentração desta vitamina no fígado cai drasticamente quando os peixes estão sob estresse, necessitando adequada reserva para enfrentar situações adversas, como períodos que antecedem a redução de temperatura.

Esta resposta foi observada, neste estudo, nos peixes alimentados com dietas suplementadas com 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta. Este nível de suplementação determinou melhor perfil hematológico, propiciando dessa maneira, maior resistência orgânica aos peixes. Fato este evidenciado quando se verifica a influência da suplementação em relação a porcentagem de sobrevivência dos peixes nos diferentes níveis de vitamina C do

desafio por bactéria.

Dietas suplementadas com elevados níveis de vitamina C podem ter efeito benéfico não só na prevenção de doenças em peixes saudáveis, como também no aumento da resistência a infecções em peixes já imunocomprometidos (Pezzato et al., 2004; Lim et al., 2005). Igualmente, a atividade de determinados mecanismos do sistema imune como o sistema complemento e a lisozima estão correlacionadas com a concentração de vitamina C nos tecidos (Chen et al., 2004).

A ausência de diferença significativa para o cortisol plasmático comparando-se os momentos e entre os peixes dos tratamentos suplementados talvez tenha ocorrido em virtude da duração do estímulo estressor, com conseqüente perda do pico de cortisol plasmático. Os peixes do tratamento controle, com suplementação de vitamina C baseada apenas na exigência para a espécie (Soliman et al., 1994), mostraram-se incapazes de manter o nível inicial de cortisol plasmático após o estresse.

A relação entre a vitamina C e a concentração plasmática de cortisol ainda não está bem estabelecida. Hardie et al. (1991) e Ortuno et al. (2002) demonstraram correlação inversa entre nível de suplementação de vitamina C na dieta e cortisol plasmático. Porém, em pesquisas desenvolvidas com a carpa comum, bagre do canal e salmão do Atlântico não foi observado este efeito (Dabrowska et al., 1991; Davies et al., 1998; Li et al., 1998).

A suplementação de vitamina C em níveis elevados também pode auxiliar a resposta do sistema imune diminuindo a toxicidade dos radicais livres reativos do oxigênio e melhorando a estabilização da membrana lipídica (Panushi e Delafuente, 1985; Secombes et al., 1988; Lall e Oliver, 1993). O aumento na produção de intermediários reativos do oxigênio pelos monócitos/macrófagos e neutrófilos é considerado bom indicador da ativação do sistema imune não específico em peixes (Jeney e Anderson, 1993; Jorgensen e Robertsen, 1995).

Baixas temperaturas causam redução na produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio por macrófagos (Hardie et al., 1994). Resposta semelhante foi observada neste estudo para a concentração do reativo intermediário do oxigênio e tendência para a concentração do reativo intermediário do nitrogênio, os quais sofreram redução quando do estímulo pelo frio.

A suplementação com maior nível de  $\beta$ -glucano na dieta apresentou menor produção de reativos intermediários, proporcionando menor resistência tanto nos peixes do estímulo pelo frio como para os infectados por *A. hydrophila*. Estes resultados confirmam os anteriormente apresentados com relação à produção de células brancas de defesa.

Respostas de imunossupressão relacionadas com altas dosagens de  $\beta$ -glucano foram igualmente observadas por outros autores. Couso et al. (2003) relataram em dourada menor resistência quando desafiada com *Photobacterium damsela*, com produção do reativo intermediário do oxigênio similar ao da dieta ausente de suplementação; Jeney et al. (1997) demonstraram que trutas arco-íris tornaram-se mais susceptíveis a infecção por *Flavobacterium colummaris*; Robertsen et al. (1990) demonstraram para salmão do Atlântico alta mortalidade quando injetado intraperitonealmente com elevadas concentrações de  $\beta$ -glucano e Whittington et al. (2005) relataram diminuição da resposta imunológica da tilápia do Nilo quando alimentada com dietas suplementadas com níveis superiores a 0,1% de  $\beta$ -glucano e desafiadas por *Streptococcus iniae*. Estes autores inferiram, ainda, que as altas dosagens de  $\beta$ -glucano podem determinar a exaustão das células fagocíticas com conseqüente diminuição da atividade. Castro et al. (2006) ressaltaram não só a exaustão do sistema imune frente a concentrações elevadas de  $\beta$ -glucano, mas também a potência e rapidez desta resposta.

Igualmente as altas dosagens, o período prolongado também pode determinar imunossupressão. Estas respostas foram descritas para truta arco-íris desafiada com *Vibrio anguillarum* (Matsuo e Miyazano, 1993), assim como em bagre do canal (Yoshida et al., 1995), sugerindo “feedback” negativo do  $\beta$ -glucano (Burrells et al., 2001). De maneira semelhante, a administração contínua de  $\beta$ -glucano por 40 dias promoveu fadiga no sistema imune, como resultado do estado de alerta intermitente em camarão, *Penaeus monodon* (Chang et al., 2000).

Os resultados deste estudo demonstraram similaridade aos anteriormente apresentados. Porém, vários fatores podem contribuir para alterações no sistema imune de defesa não específico contra bactéria e para a resistência frente situações adversas. Embora tenha sido avaliada somente a produção de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, esses permitem apontar redução na produção destes intermediários, principalmente nos peixes alimentados com dietas suplementadas com 0,8% de  $\beta$ -glucano. No entanto, futuras pesquisas necessitam ser conduzidas envolvendo outros parâmetros imunológicos, os quais em conjunto, permitam esclarecer os mecanismos pelos quais elevadas concentrações de  $\beta$ -glucano interferem na resposta imune da tilápia do Nilo.

Ressalta-se, também, que o protocolo de suplementação (período de administração, forma e a concentração do imunoestimulante) possui influência nas respostas, tornando os resultados por vezes contraditórios. Gannam e Schrock (2001) destacaram ainda a



importância da estrutura do glucano para sua atividade. Por essas razões, o produto e sua atividade devem ser avaliados cuidadosamente, pois comparações tornam-se difíceis quando da utilização de produtos comerciais.

Avaliando-se os resultados de mortalidade cumulativa após o desafio pela bactéria, observou-se que foram representativos em relação aos resultados dos parâmetros anteriormente discutidos para esse desafio. Em síntese, a porcentagem de sobrevivência evidenciou menor atividade do sistema imune dos peixes alimentados com dietas suplementadas com níveis elevados de  $\beta$ -glucano, além de demonstrar melhor resistência orgânica dos peixes alimentados com dietas suplementadas com 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano.

A ação do  $\beta$ -glucano relacionada com a porcentagem de sobrevivência foi igualmente reportada por Jeney et al. (1997) para trutas arco-íris com imunossupressão e aumento da mortalidade quando alimentadas com dietas suplementadas com 1,0% de  $\beta$ -glucano na dieta e desafiadas por *F. columnaris*. Sahoo e Mukherjee (2002) sugeriram que a inclusão de 1,3  $\beta$ -glucano nas dietas para carpa indiana sob condições de imunossupressão ou estresse, podem aumentar a resistência contra infecções e reduzir a porcentagem de mortalidade e, Burrels et al. (2001) em pesquisa com salmonídeos, observaram que a suplementação de 0,2% de  $\beta$ -glucano na dieta resultou em tendência de menor mortalidade em caso de infecção com *Vibrio anguillarum*.

Neste estudo observou-se, ainda, que a suplementação com o maior nível de vitamina C evidenciou, embora não de forma significativa, a capacidade desta em proporcionar aporte necessário para manter o sistema imune responsivo frente a infecção por *A. hydrophila*, principalmente nos níveis de 0,1 e 0,2% de  $\beta$ -glucano. Resposta similar foi reportada por Kumari e Sahoo (2005) para *Clarias batrachus* com maior porcentagem de sobrevivência quando alimentados com dietas suplementadas com 500,0 mg de vitamina C/kg e desafiados pela *A. hydrophila*, por Sobhana et al. (2002) para carpa, *Cirrhinus mrigala*, com aumento da sobrevivência, da atividade fagocítica e da resistência contra *Aeromonas hydrophila*, quando alimentadas com dietas suplementadas com altas concentrações de vitamina C; assim como, por Ai et al. (2006) os quais relataram que a mortalidade cumulativa diminuiu à medida que aumentou o nível de vitamina C na dieta de *Pseudosciaena crocea* desafiado com bactéria. Contrariamente, Nitzan et al. (1996) não constataram efeito significativo da suplementação de vitamina C em relação à porcentagem de sobrevivência em híbridos de tilápia, *Oreochromis aureus* x *O. niloticus*, submetidos ao desafio por *A. hydrophila* e Selvaraj et al. (2005), não observaram efeito da suplementação de  $\beta$ -glucano em carpa comum desafiada pela mesma

bactéria.

Os resultados permitem concluir que a suplementação de  $\beta$ -glucano e vitamina C não influenciam o desempenho produtivo da tilápia do Nilo; que a suplementação de 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta determina melhores respostas imunes frente ao estímulo pelo frio e desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila* e que, níveis elevados de suplementação de  $\beta$ -glucano (0,4 e 0,8%) promovem redução dos parâmetros imunológicos avaliados, independente da suplementação de vitamina C.

### Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de estudo concedida e a BIORIGIN pelo apoio científico.

### Referências

- AI, Q.; MAI, K.; TAN, B.; XU, W.; ZHANG, W.; MA, H.; LIUFU, Z. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, v.261, p.327-336, 2006.
- ALVES DE ANDRADE, J.I.; ONO, E.A.; BRASIL, E.M.; MENEZES, G.C.; MATSUURA, T.; SOUZA, R.T.Y.B.; OLIVEIRA, S.R.; TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E.G. Influência da vitamina C na dieta do matrinhã *Brycon amazonicus* após infecção por *Aeromonas hydrophila*. In: Aquaciência, 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* CD-ROM.
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.2, p.281-307, 1992.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Chichester: Ellis Horwood, 1987. 364p.
- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M.G.; ALBELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P.G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short – and long-term effects of a dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.*, v.18, p.311-325, 2005.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; KLEEMANN, G.K.; HISANO, H.; ROSA, G.J.M. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Brás. Zootec.*, v.51, p.2149-2156, 2002.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; HISANO, H.; FALCON, D.R.; SÁ, M.V.C. Farinha de sangue tostada em dietas práticas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scient.*, v.26, p.5-13, 2004.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R.; GUIMARÃES, I.G. Nutrição e saúde de peixes. In: COLÉGIO LATINO-AMERICANO de NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. CD-ROM.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of cortivosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.1, p.3-26, 1991.

- BRENDEN, S.A.; HUIZINGA, H.W. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection goldfish, *Carassius auratus* L. *J. Fish Dis.*, v.9, p.163-167, 1986.
- BURRELS, C.; WILLIAMS, P.D.; FORNO, P.F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds, effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture*, v.199, p.159-169, 2001.
- CASTRO, R.; PIAZZON, M.C.; ZARRA, I.; LEIRO, J.; NOYA, M.; LAMAS, J. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture*, v.254, p.9-20, 2006.
- CHANG, C.F.; CHEN, H.Y.; SU, M.S.; LIAO, I.C. Immunomodulation by dietary beta-1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.10, n.6, p.505-514, 2000.
- CHEN, R.G.; LOCHMANN, R.T.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.J. Effects of dietary vitamin C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentration and response to heat stress in juvenile golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, v.242, p.553-569, 2004.
- 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 Immunol.*, v.14, n.4, p.333-345, 2003.
- COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARINOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*, v.219, p.99-109, 2003.
- DABROWSKA, H.; DABROWSKI, K.; MEYER-BURGDORFF, K.; HANKE, W.; GUNTHER, K.D. The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.89b, p.539-545, 1991.
- DAVIES, K.B.; SIMCO, B.A.; LI, M.; ROBINSON, E. Effect of reduction of supplemental dietary vitamins on the stress response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. World Aquacult. Soc.*, v.29, p.319-324, 1998.
- EFTHIMIOU, S. Dietary intake of  $\beta$ -1,3/1,6 glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae: effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. *J. Appl. Ichthyol.*, v.12, p.1-7, 1996.
- EL NAGGAR, G.O.; LOVELL, R.T. L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic for channel catfish. *J. Nutr.*, v.121, p.1622-6, 1991.
- ENGLESMA, M. Acute temperature stress effects on leucocyte populations and antibody response in carp, *Cyprinus carpio* L. In: — Neuroendocrine-immune interaction in *carp*: a role for cortisol and interleukin-1. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 2002. p.158.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, v.17, p.319-330, 1993.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- FRACALOSSO, D.M.; ALLEN, M.E.; NICHOLS, D.K.; OFTEDAL, O. Oscars, *Astronotus ocellatus*, Have a dietary requirement for vitamin C. *J. Nutr.*, v.128, p.1745-51, 1998.
- FRERICHS, G.N.; MILLAR, S.D. *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Stirling: Pisces Press, 1993. 60p.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PEZZATO, A.C.; FURUYA, V.R.B.; MIRANDA, E.C. Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acids in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, v.35, p.1110-1116, 2004.

- GANNAM, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in fish diets. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. p.235-260.
- GATLIN III, D.M. Nutrition and fish health. In: HALVER, J.E., HARDY, R.W. (Ed.). *Fish Nutrition*. 3<sup>o</sup>ed. Amsterdam: Academic Press, 2002. p.671-702.
- GREEN, L.C.; LUGURIAGA, V.R.; WAGUER, D.A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YEUNG, V.R.; TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.78, p.7764-7768, 1981.
- HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, v.18, p.57-66, 1994.
- HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, v. 95, p.201-214, 1991.
- 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.
- HENRIQUE, M.M.F.; GOUILLOU-COUSTANS, M.F.; GOMES, E. Effect of dietary ascorbic acid supplementation and chronic hypoxia on sea bream growth and vitamin C status. *J. Fish Biol.*, v.60, p.442-452, 2002.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, p.29, 2000.
- JAIN, N.C. *Schalm's veterinary haematology*. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986. 1221p.
- JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v.116, p.315-329, 1993.
- 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.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. *Applied multivariate statistical analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998. 816p.
- JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast  $\beta$ -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, v.19, p.43-57, 1995.
- KUMARI, J.; SAHOO, P.K. High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Mol. Cel. Biochem.*, v.280, p.25-33, 2005.
- LALL, S.P.; OLIVIER, G. Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish. In: KAUSHIK, S.J.; LUQUET, P. (Eds.). *Fish Nutrition in practice*. Paris: INRA, 1993. p.101-118.
- LEE, S.Y.; YIN, Z.; GE, R.; SIN, Y.M. Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for in vitro epithelial cell invasion. *Journal of Fish Diseases*, v.120, p.169-175, 1997.
- LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on tissue vitamin C concentration in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and clearance rate at two temperatures- A preliminary investigation. *J. Appl. Aquacult.*, v.4, p.59-71, 1994.
- LI, M.H.; WISE, D.J.; ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.*, v.29, p.1-8, 1998.

- LIM, C.; SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H. The effect of ascorbic acid on the immune response in fish. In: DABROWSKI, K. (Ed.). *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms*. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.149-166.
- LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P.H. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: SIMPÓSIO de NUTRIÇÃO e SAÚDE de PEIXES, 1., 2005, Botucatu. *Anais...Botucatu*, 2005. p.46-83.
- LIU, P.R.; PLUMB, J.A.; GUERIN, M.; LOVELL, R.T. Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Dis. Aquat. Org.*, v.7, p.191-194, 1989.
- LOVELL, R.T. *Nutrition and feeding of fish*. 2.ed. Massachusetts: Academic Press, 1998. 267p.
- MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK JR., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca*, v.30, p.71-80, 2004.
- MATSUO, K.; MIYAZANO, I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkai Shi*, v.59, p.1377-1379, 1993.
- 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.
- 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.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrient requirements of fish*. Washington: Academy Press, 1993. 125p.
- NAVARRÉ, O.; HALVER, J.E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, v.79, p.207-221, 1989.
- NIKL, L.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T.P.T. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, v.12, p.7-12, 1991.
- NITZAN, S.; ANGEONI, H.; GUR, N. Effects of ascorbic acid polyphosphate (AAPP) enrichment on growth, survival and disease resistance of hybrid tilapia. *Isr. J. Aquacult.*, v.48, p.133-141, 1996.
- NOGA, E.J. Diagnoses made by affected organs. In: —. *Fish diseases: diagnosis and treatment*. Ames: Iowa State University, 2000. p.139-162.
- NORRGREN, L.; BORJESON, H.; FORLIN, L.; AKERBLÖM, N. The role of ascorbic acid and its derivatives in resistance to environmental and dietary toxicity of aquatic organisms. In: DABROWSKI, K. (Ed.). *Ascorbic acid in aquatic organisms*. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.167-189.
- OLIVER, G.; EATON, C.A.; CAMPBELL, N. Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.12, p.223-234, 1986.
- ORTUNO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, v.12, p.1-12, 2002.
- PANUSHI, R.S.; DELAFUENTE, J.C. Vitamins and immunocompetence. *World Rev. Nutr. Diet*, v.45, p.97-123, 1985.

- PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004. p.74-169.
- PICK, E.; MIZEL, D. Rajid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophage in culture using and automatic enzyme immunoassayreader. *J. Immunol.*, v.46, p.211-226, 1981.
- PICKERING, A.D. Changes in blood cell composition of the brow trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season. *J. Fish Biol.*, v.29, p.335-347, 1986.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta*, to disease without reducing the white blood cell count. *J. Fish Biol.*, v.27, p.611-619, 1985.
- PLUMB, J.A.; BOWSER, P.R. *Microbial fish disease laboratory manual*. Alabama: Auburn University, Alabama Agriculture Experiment Station, 1983. 95p.
- PLYZYCZ, B.; FLORY, C.M.; GALVAN, I.; BAYNE, C.J. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Dev. Comp. Immunol.*, v.13, p.217-224. 1989.
- RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v. 4, n.3, p.229-288, 1996.
- RAA, J.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M., SUBASINGLE, R.P.; ARTHUR, J.R. *Disease Asian Aquaculture I*, Bali: Indonésia, Asian Fisheries Society, 1992. p.39-50.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.  $\beta$ -glucans as immunostimulants in fish. In: STOLEN, J.; FLETCHER, T.C. (Eds.). *Modulators of fish immune responses*. Fair Haven: SOS Publications, 1994. p.83-99.
- 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 wall. *J. Fish Dis.*, v.13, p.391-400, 1990.
- 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 Immunol.*, v.11, p.683-695, 2001.
- SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish Shellfish Immunol.*, v.12, p.1-16, 2002.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, v.172, p.63-92, 1999.
- SECOMBES, C.J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: STOLEN, J.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; VAN MUISWINKEL, W.B. (Eds). *Techniques in fish Immunology*. Fair Haven: SOS Publications, 1990. p.137-154.
- SECOMBES, C.J.; CHUNG, S.; JEFFRIES, A.H. Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. *Dev. Comp. Immunol.*, v.48, p.201-206, 1988.
- 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 Immunol.*, v.19, p.293-306, 2005.
- SOBHANA, K.S.; MOHAN, C.V.; SHANKAR, K.M. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflamamatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, v.207, p.225-238, 2002.

- SOLIMAN, A. K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.*, v.25, p.269-278, 1994.
- THOMAS, J.S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.891-989.
- THOMPSON, I.; WHITE, A.; FLETCHER, T.C.; HOULIHAN, D.F. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, v.114, p.1-18, 1993.
- VERLHAC, V.; OBACH, J.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, v.8, p.409-424, 1998.
- VOLPATTI, D.; D'ANGELO, L.; JENEY, G.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P.; GALEOTTI, M. Non specific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *J. Appl. Ichthyol.*, v.14, p.201-206, 1998.
- WAAGBO, R.; GLETTE, J.; RAA-NILSEN, E.; SANDNES, K. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, v.12, p.61-73, 1993.
- WANG, X.Y.; MING-LONG, L.; HUNG, T.H.; SEIB, P.A. Liquid chromatographic determination of L-ascorbate 2-polyphosphate in fish feeds by enzymatic release of L-ascorbate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.71, p.1158-1161, 1988.
- WEDEMEYER, G. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.29, p.1247-1251, 1969.
- 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.217-225, 2005.
- YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by long-term administration of immunostimulants. *J. Fish Dis.*, v.18, p.195-198, 1995.

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

Ingrediente	0,0 $\beta$ -glucano		0,1 $\beta$ -glucano		0,2 $\beta$ -glucano		0,4 $\beta$ -glucano		0,8 $\beta$ -glucano	
	125 vit C	400 vit C	600 vit C	400 vit C	600 vit C	400 vit C	600 vit C	400 vit C	600 vit C	600 vit C
Farelo soja	28,520	28,520	28,520	28,520	28,520	28,520	28,520	28,520	28,520	28,520
Gluten de milho	14,088	14,088	14,088	14,088	14,088	14,088	14,088	14,088	14,088	14,088
Farinha peixe	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Farinha carne -40	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500
Fubá milho	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Farelo trigo	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500
Quirera de arroz	27,150	27,150	27,150	27,150	27,150	27,150	27,150	27,150	27,150	27,150
Amido de milho	1,072	0,880	0,823	0,763	0,706	0,647	0,590	0,533	0,476	0,420
Celulose	2,380	2,380	2,380	2,380	2,380	2,380	2,380	2,380	2,380	2,380
L-lisina	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970
DL-metionina	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380
Triptofano	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
Treonina	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380
Fosfato bicálcico	3,380	3,380	3,380	3,380	3,380	3,380	3,380	3,380	3,380	3,380
Sal comum	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Suplem vit e min <sup>1</sup>	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
BHT <sup>2</sup>	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
$\beta$ -glucano <sup>3</sup>	---	0,118	0,118	0,235	0,235	0,471	0,471	0,471	0,471	0,471
Vitamina C <sup>4</sup>	0,040	0,114	0,171	0,114	0,171	0,114	0,171	0,114	0,171	0,114
TOTAL (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

	Composição químico-bromatológica	
	100	100
Energia digestível (kcal/kg)	3000,00	3000,00
Proteína digestível (%)	28,00	28,00
Fibra bruta (%)	5,00	5,00
Extrato etéreo (%)	2,63	2,63
Cálcio total (%)	2,00	2,00
Fósforo disponível (%)	0,80	0,80
DL - metionina (%)	0,75	0,75
AAS (%)	0,91	0,91
L- lisina (%)	2,10	2,10
Triptofano (%)	0,26	0,26
Treonina (%)	1,23	1,23
Vitamina C (mg/kg)*	92,00	312,00

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico e mineral (Supre Mais, níveis/kg do produto): Vitamina A, 1.200.000 UI; Vitamina D<sub>3</sub>, 200.000 UI; Vitamina E, 1.200 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 2.400 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 4.800 mg; Vitamina C, zero<sup>5</sup>; Pantotênato de cálcio, 12.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Ácido fólico, 1.200 mg; Biotina, 48 mg; Cloreto de colina, 108 g; Cobalto, 10 mg; Cobre, 3.000 mg; Sulfato ferroso heptahidratado, 50.000 mg; Iodo, 100 mg; Manganês, 20.000 mg; Selênio, 100 mg; Sulfato de zinco, 30.000 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g.<sup>2</sup> Antioxidante; <sup>3</sup>  $\beta$ -glucano 85,0%; <sup>4</sup> Vitamina C 35,0% ativa; <sup>5</sup> Adequado à pesquisa; \* Analisado



Tabela 2. Valores médios e desvio-padrão do ganho de peso por peixe (GPP), consumo aparente da dieta (CAD) e conversão alimentar aparente (CAA) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de  $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) durante 60 dias<sup>1</sup>

$\beta$ -Glucano (%)	Vit C (mg/kg)	GPP (g)	CAD (g)	CAA
0	125	87,26 ( $\pm$ 8,70)	99,75 ( $\pm$ 6,87)	1,15 ( $\pm$ 0,09)
0,1	400	88,25 ( $\pm$ 5,08)	97,00 ( $\pm$ 2,70)	1,10 ( $\pm$ 0,05)
0,2	400	87,84 ( $\pm$ 2,28)	95,13 ( $\pm$ 3,72)	1,09 ( $\pm$ 0,05)
0,4	400	84,14 ( $\pm$ 5,29)	94,11 ( $\pm$ 1,44)	1,12 ( $\pm$ 0,03)
0,8	400	84,83 ( $\pm$ 1,79)	99,18 ( $\pm$ 5,53)	1,17 ( $\pm$ 0,04)
0,1	600	88,25 ( $\pm$ 3,00)	93,37 ( $\pm$ 4,15)	1,09 ( $\pm$ 0,05)
0,2	600	87,49 ( $\pm$ 6,48)	96,59 ( $\pm$ 6,20)	1,11 ( $\pm$ 0,03)
0,4	600	86,99 ( $\pm$ 1,21)	95,59 ( $\pm$ 2,40)	1,10 ( $\pm$ 0,04)
0,8	600	89,97 ( $\pm$ 2,93)	103,63 ( $\pm$ 3,29)	1,16 ( $\pm$ 0,02)
<sup>2</sup> Cont. vs Fat.		ns	ns	ns
$\beta$ -Gluc <sup>3</sup>		ns <sup>6</sup>	ns	ns
0,1		88,25	95,19	1,10
0,2		87,67	95,86	1,10
0,4		85,57	94,85	1,11
0,8		87,40	101,41	1,17
Vit C <sup>4</sup>		ns	ns	ns
400		86,27	96,36	1,12
600		88,18	97,30	1,12
$\beta$ -Gluc x Vit C <sup>5</sup>		ns <sup>6</sup>	ns	ns

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de  $\beta$ -glucano dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de  $\beta$ -glucano; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; <sup>2</sup> Controle (ausente de suplementação de  $\beta$ -glucano e 125,0 mg de vitamina C/kg dieta) vs Fatorial, nível P; <sup>3</sup> Efeito do  $\beta$ -glucano, nível P; <sup>4</sup> Efeito da vitamina C, nível P; <sup>5</sup> Interação entre  $\beta$ -glucano e vitamina C, nível P; <sup>6</sup> Não significativo (P>0,05).

Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão inicial e final do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc) e taxa de hemoglobina (Hb) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de  $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio (frio) e desafio com *Aeromonas hydrophila* (bact)<sup>1</sup>

$\beta$ -Glucano (%)	Vit C (mg/kg)	Erit (10 <sup>6</sup> / $\mu$ L)		Erit final		Htc inicial (%)		Htc final		Hb inicial (g/dL)		Hb final	
		inicial	final	frio	bact	inicial	final	frio	bact	inicial	final	frio	bact
0	125	1,92 $\alpha$ ( $\pm$ 0,06)	1,45 $\beta$ ( $\pm$ 0,15)	1,54 $\beta$ ( $\pm$ 0,12)	26,25 $\alpha$ ( $\pm$ 0,43)	23,80 $\beta$ ( $\pm$ 0,55)	23,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,42)	5,75 ( $\pm$ 0,67)	4,98 ( $\pm$ 0,85)	4,99 ( $\pm$ 1,22)			
0,1	400	1,92 $\alpha$ ( $\pm$ 0,07)	1,68 $\beta$ ( $\pm$ 0,19)	1,61 $\beta$ ( $\pm$ 0,10)	27,80 $\alpha$ ( $\pm$ 1,30)	23,25 $\beta$ ( $\pm$ 2,86)	21,80 ( $\pm$ 6,54)	5,91 ( $\pm$ 1,57)	5,45 ( $\pm$ 0,89)	4,51 ( $\pm$ 1,44)			
0,2	400	2,03 $\alpha$ ( $\pm$ 0,14)	1,55 $\beta$ ( $\pm$ 0,41)	1,66 $\beta$ ( $\pm$ 0,14)	28,40 $\alpha$ ( $\pm$ 1,82)	23,60 $\beta$ ( $\pm$ 2,30)	22,20 ( $\pm$ 6,02)	6,56 ( $\pm$ 0,76)	5,24 ( $\pm$ 1,46)	5,63 ( $\pm$ 1,90)			
0,4	400	2,11 $\alpha$ ( $\pm$ 0,19)	1,66 $\beta$ ( $\pm$ 0,30)	1,65 $\beta$ ( $\pm$ 0,16)	27,20 $\alpha$ ( $\pm$ 1,30)	25,00 $\beta$ ( $\pm$ 1,77)	23,60 ( $\pm$ 4,97)	6,05 ( $\pm$ 0,58)	5,41 ( $\pm$ 0,83)	5,86 ( $\pm$ 1,09)			
0,8	400	1,99 $\alpha$ ( $\pm$ 0,14)	1,39 $\beta$ ( $\pm$ 0,29)	1,55 $\beta$ ( $\pm$ 0,04)	27,40 $\alpha$ ( $\pm$ 2,19)	24,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,77)	24,80 ( $\pm$ 6,30)	6,02 ( $\pm$ 0,70)	5,19 ( $\pm$ 1,17)	5,47 ( $\pm$ 0,95)			
0,1	600	1,98 $\alpha$ ( $\pm$ 0,13)	1,70 $\beta$ ( $\pm$ 0,06)	1,70 $\beta$ ( $\pm$ 0,26)	28,40 $\alpha$ ( $\pm$ 1,95)	23,00 $\beta$ ( $\pm$ 2,12)	22,20 ( $\pm$ 6,90)	6,67 ( $\pm$ 0,63)	4,97 ( $\pm$ 0,91)	5,14 ( $\pm$ 1,32)			
0,2	600	2,03 $\alpha$ ( $\pm$ 0,12)	1,58 $\beta$ ( $\pm$ 0,23)	1,69 $\beta$ ( $\pm$ 0,12)	26,80 $\alpha$ ( $\pm$ 1,97)	23,40 $\beta$ ( $\pm$ 1,27)	22,40 ( $\pm$ 4,22)	6,68 ( $\pm$ 0,92)	5,39 ( $\pm$ 1,59)	5,63 ( $\pm$ 1,15)			
0,4	600	1,99 $\alpha$ ( $\pm$ 0,11)	1,63 $\beta$ ( $\pm$ 0,24)	1,62 $\beta$ ( $\pm$ 0,16)	27,20 $\alpha$ ( $\pm$ 1,64)	24,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,95)	22,60 ( $\pm$ 5,97)	6,26 ( $\pm$ 0,50)	6,16 ( $\pm$ 1,10)	4,88 ( $\pm$ 2,89)			
0,8	600	1,99 $\alpha$ ( $\pm$ 0,13)	1,41 $\beta$ ( $\pm$ 0,30)	1,51 $\beta$ ( $\pm$ 0,07)	27,80 $\alpha$ ( $\pm$ 1,64)	24,60 $\beta$ ( $\pm$ 1,71)	23,20 ( $\pm$ 4,76)	6,52 ( $\pm$ 0,42)	4,67 ( $\pm$ 1,45)	5,02 ( $\pm$ 1,53)			
<sup>2</sup> Cont. vs Fat.		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
$\beta$ -Gluc <sup>3</sup>		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
0,1		1,95	1,69	1,66	28,10	23,13	22,00	6,29	5,21	4,83			
0,2		2,03	1,57	1,68	27,60	23,50	22,30	6,62	5,32	5,63			
0,4		2,05	1,65	1,64	27,20	24,90	23,10	6,16	5,79	5,37			
0,8		1,99	1,40	1,53	27,60	24,70	24,00	6,27	4,93	5,25			
Vit C <sup>4</sup>		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
400		2,01	1,57	1,72	27,70	24,16	23,10	6,14	5,32	5,37			
600		2,00	1,58	1,63	27,55	23,95	22,60	6,53	5,30	5,17			
$\beta$ -Gluc x Vit C <sup>5</sup>		ns <sup>6</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de  $\beta$ -glucano dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de  $\beta$ -glucano; Letras gregas comparam um mesmo nível de  $\beta$ -glucano e vitamina C nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; <sup>2</sup> Controle (ausente de suplementação de  $\beta$ -glucano e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta) vs Fatorial, nível P; <sup>3</sup> Efeito do  $\beta$ -glucano, nível P; <sup>4</sup> Efeito da vitamina C, nível P; <sup>5</sup> Interação entre  $\beta$ -glucano e vitamina C, nível P; <sup>6</sup> Não significativo (P>0,05).

Tabela 4. Valores médios e desvio-padrão inicial e final do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), concentração de proteína plasmática total (PPT) e relação albumina-globulina (A:G) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de  $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio (frio) e desafio com *Aeromonas hydrophila* (bact)<sup>1</sup>

$\beta$ -Glucano (%)	Vit C (mg/kg)	VCM (fL)		VCM (%)		CHCM (%)		CHCM (g/dL)		PPT (g/dL)		PPT (g/dL)		A:G		A:G	
		inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
0	125	138,98 ( $\pm 15,35$ )	164,14 ( $\pm 26,67$ )	154,55 ( $\pm 26,69$ )	20,92 ( $\pm 7,17$ )	21,25 ( $\pm 1,97$ )	20,92 ( $\pm 7,17$ )	2,53 $\alpha$ ( $\pm 0,49$ )	1,48 $\beta$ ( $\pm 0,13$ )	2,06 ( $\pm 0,51$ )	1,58 $\beta$ ( $\pm 0,13$ )	3,11 $\alpha$ ( $\pm 0,09$ )	1,64 ( $\pm 0,38$ )	1,72 $\alpha$ ( $\pm 0,23$ )	1,42b ( $\pm 0,14$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,20$ )
0,1	400	144,50 ( $\pm 12,10$ )	138,39 $\beta$ ( $\pm 19,71$ )	135,66 ( $\pm 15,25$ )	23,46 ( $\pm 2,06$ )	21,94 ( $\pm 3,25$ )	23,46 ( $\pm 2,06$ )	2,94 $\alpha$ ( $\pm 0,47$ )	1,88a $\beta$ ( $\pm 0,15$ )	2,48 ( $\pm 0,33$ )	1,72 $\alpha$ ( $\pm 0,23$ )	1,32b $\beta$ ( $\pm 0,16$ )	1,03b $\beta$ ( $\pm 0,27$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,23$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,18$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )
0,2	400	141,76 ( $\pm 9,08$ )	152,27 $\beta$ ( $\pm 16,02$ )	132,96 ( $\pm 15,75$ )	22,22 ( $\pm 3,47$ )	23,12 ( $\pm 2,27$ )	22,22 ( $\pm 3,47$ )	2,84 $\alpha$ ( $\pm 0,35$ )	1,80ab $\beta$ ( $\pm 0,27$ )	2,72 ( $\pm 0,50$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,26$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,03b $\beta$ ( $\pm 0,18$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,26$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,18$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )
0,4	400	132,35 ( $\pm 11,03$ )	151,20 $\beta$ ( $\pm 23,78$ )	143,94 ( $\pm 21,10$ )	21,61 ( $\pm 1,72$ )	20,62 ( $\pm 2,36$ )	21,61 ( $\pm 1,72$ )	2,98 $\alpha$ ( $\pm 0,27$ )	1,74ab $\beta$ ( $\pm 0,20$ )	2,48 $\beta$ ( $\pm 0,33$ )	1,57 $\alpha$ ( $\pm 0,30$ )	1,42b ( $\pm 0,14$ )	1,03b $\beta$ ( $\pm 0,29$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,26$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,20$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )
0,8	400	148,20 $\beta$ ( $\pm 18,10$ )	180,62a $\alpha$ ( $\pm 12,69$ )	159,37 ( $\pm 35,86$ )	22,62 ( $\pm 4,81$ )	25,15 ( $\pm 3,69$ )	22,62 ( $\pm 4,81$ )	3,26 $\alpha$ ( $\pm 0,30$ )	1,54b $\beta$ ( $\pm 0,05$ )	2,64 $\beta$ ( $\pm 0,35$ )	1,63 ( $\pm 0,43$ )	1,96a ( $\pm 0,22$ )	1,03b $\beta$ ( $\pm 0,20$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,26$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,20$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )
0,1	600	144,19 ( $\pm 13,43$ )	136,00 $\beta$ ( $\pm 19,42$ )	131,28 ( $\pm 19,32$ )	21,70 ( $\pm 1,54$ )	23,52 ( $\pm 1,53$ )	21,70 ( $\pm 1,54$ )	2,80 $\alpha$ ( $\pm 0,37$ )	1,85a $\beta$ ( $\pm 0,27$ )	2,72 ( $\pm 0,41$ )	1,92 $\alpha$ ( $\pm 0,33$ )	0,97b $\beta$ ( $\pm 0,23$ )	0,88b $\beta$ ( $\pm 0,28$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,26$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,20$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )
0,2	600	128,15 ( $\pm 23,32$ )	149,49 $\beta$ ( $\pm 28,24$ )	132,92 ( $\pm 26,33$ )	23,00 ( $\pm 1,68$ )	24,70 ( $\pm 2,12$ )	23,00 ( $\pm 1,68$ )	2,86 $\alpha$ ( $\pm 0,61$ )	1,60ab $\beta$ ( $\pm 0,25$ )	2,52 ( $\pm 0,64$ )	1,86 $\alpha$ ( $\pm 0,35$ )	1,39b $\beta$ ( $\pm 0,43$ )	0,97b $\beta$ ( $\pm 0,28$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,26$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,20$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )
0,4	600	132,23 ( $\pm 15,97$ )	153,36 $\beta$ ( $\pm 23,71$ )	139,30 ( $\pm 22,88$ )	25,03 ( $\pm 5,41$ )	23,62 ( $\pm 3,16$ )	25,03 ( $\pm 5,41$ )	2,94 $\alpha$ ( $\pm 0,18$ )	1,58ab $\beta$ ( $\pm 0,38$ )	2,40 $\beta$ ( $\pm 0,21$ )	1,80 $\alpha$ ( $\pm 0,19$ )	1,43b ( $\pm 0,29$ )	1,24b $\beta$ ( $\pm 0,39$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,26$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,20$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )
0,8	600	127,29 $\beta$ ( $\pm 15,88$ )	182,64a $\alpha$ ( $\pm 16,12$ )	152,77 ( $\pm 26,18$ )	19,00 ( $\pm 4,09$ )	24,06 ( $\pm 3,03$ )	19,00 ( $\pm 4,09$ )	3,02 $\alpha$ ( $\pm 0,31$ )	1,52b $\beta$ ( $\pm 0,08$ )	2,56 $\beta$ ( $\pm 0,33$ )	1,67 ( $\pm 0,30$ )	1,87a ( $\pm 0,19$ )	1,88a ( $\pm 0,27$ )	1,87 $\alpha$ ( $\pm 0,26$ )	1,47b $\beta$ ( $\pm 0,17$ )	1,96a ( $\pm 0,20$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )
<sup>2</sup> Cont. vs Fat.		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,05	ns	ns	0,05	0,05	ns	ns	ns	0,05
$\beta$ -Gluc <sup>3</sup>		ns	0,05	ns	ns	ns	ns	ns	0,05	ns	ns	0,05	0,05	ns	ns	ns	0,05
0,1		144,35	137,20	133,47	22,73	22,73	22,58	2,87	1,87	2,60	1,82	1,15	0,96	1,87	1,70	1,43	1,00
0,2		134,96	150,88	132,94	23,91	23,91	22,61	2,85	1,70	2,62	1,87	1,43	1,00	1,87	1,70	1,43	1,00
0,4		132,29	152,28	141,62	22,12	22,12	23,32	2,96	1,66	2,44	1,69	1,43	1,19	1,69	1,69	1,43	1,19
0,8		137,75	181,63	156,07	24,61	24,61	20,10	3,14	1,53	2,60	1,65	1,92	1,91	1,65	1,65	1,42	1,24
Vit C <sup>4</sup>		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
400		141,70	155,62	142,98	22,71	22,71	22,12	3,01	1,74	2,58	1,70	1,54	1,28	1,74	1,74	1,42	1,24
600		132,97	155,37	139,07	23,98	23,98	22,18	2,91	1,64	2,55	1,81	1,42	1,24	1,64	1,64	1,42	1,24
$\beta$ -Gluc C x Vit <sup>5</sup>		ns <sup>6</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de  $\beta$ -glucano dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de  $\beta$ -glucano; Letras gregas comparam um mesmo nível de  $\beta$ -glucano e vitamina C nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; <sup>2</sup> Controle (ausente de suplementação de  $\beta$ -glucano e 125,0 mg de vitamina C/kg dieta) vs Fatorial, nível P; <sup>3</sup> Efeito do  $\beta$ -glucano, nível P; <sup>4</sup> Efeito da vitamina C, nível P; <sup>5</sup> Interação entre  $\beta$ -glucano e vitamina C, nível P; <sup>6</sup> Não significativo (P>0,05).

Tabela 5. Valores médios e desvio-padrão inicial e final do número de leucócitos totais (Leuc total), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr) e porcentagem de monócitos (Mon) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de  $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio (frio) e desafio com *Aeromonas hydrophila* (bact)<sup>1</sup>

$\beta$ -Gluc (%)	Vit C (mg/kg)	Leuc		Linf		Linf		Linf		Linf		Neutr		Neutr		Neutr		Mon		Mon			
		inicial ( $\mu$ L)	final	inicial (%)	final	inicial (%)	final	inicial (%)	final	inicial (%)	final	inicial (%)	final	inicial (%)	final	inicial (%)	final	inicial (%)	final	inicial (%)	final		
0	125	79375,00 $\alpha$ ( $\pm$ 12631,81)	50100,00 $\beta$ ( $\pm$ 10686,15)	88,00 $\alpha$ ( $\pm$ 1,41)	79,25 $\beta$ ( $\pm$ 3,77)	74,00 ( $\pm$ 14,87)	7,33 $\beta$ ( $\pm$ 0,82)	15,00 $\alpha$ ( $\pm$ 1,87)	4,00 ( $\pm$ 0,71)	18,55 ( $\pm$ 8,46)	5,75 ( $\pm$ 2,49)	6,50 ( $\pm$ 2,70)	15,25 $\alpha$ ( $\pm$ 0,82)	27,00 $\alpha$ ( $\pm$ 0,70)	26,25 $\alpha$ ( $\pm$ 1,22)	26,25 $\alpha$ ( $\pm$ 2,90)	26,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,21)	12,25 $\beta$ ( $\pm$ 3,94)	3,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,86)	9,00 ( $\pm$ 5,55)	8,55 ( $\pm$ 1,73)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)
0,1	400	87775,00 $\alpha$ ( $\pm$ 12631,81)	79400,00 ( $\pm$ 24484,47)	83,60 $\alpha$ ( $\pm$ 4,34)	65,00 $\beta$ ( $\pm$ 4,33)	57,75 $\beta$ ( $\pm$ 2,50)	10,60 $\beta$ ( $\pm$ 2,30)	26,00 $\alpha$ ( $\pm$ 1,22)	4,20 $\beta$ ( $\pm$ 2,28)	27,00 $\alpha$ ( $\pm$ 0,70)	9,00 ( $\pm$ 4,27)	15,25 $\alpha$ ( $\pm$ 0,82)	27,00 $\alpha$ ( $\pm$ 0,70)	26,25 $\alpha$ ( $\pm$ 2,90)	26,25 $\alpha$ ( $\pm$ 2,90)	26,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,21)	12,25 $\beta$ ( $\pm$ 3,94)	3,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,86)	9,00 ( $\pm$ 5,55)	8,55 ( $\pm$ 1,73)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)	
0,2	400	91125,00 $\alpha$ ( $\pm$ 12030,34)	77400,00 $\beta$ ( $\pm$ 13813,04)	88,40 $\alpha$ ( $\pm$ 2,70)	65,20 $\beta$ ( $\pm$ 4,18)	58,25 $\beta$ ( $\pm$ 3,79)	8,60 $\beta$ ( $\pm$ 2,97)	26,25 $\alpha$ ( $\pm$ 2,90)	2,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,92)	25,25 $\alpha$ ( $\pm$ 1,80)	8,55 ( $\pm$ 5,75)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	25,25 $\alpha$ ( $\pm$ 1,80)	26,25 $\alpha$ ( $\pm$ 2,90)	26,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,21)	12,25 $\beta$ ( $\pm$ 3,94)	3,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,86)	9,00 ( $\pm$ 5,55)	8,55 ( $\pm$ 1,73)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)		
0,4	400	90125,00 $\alpha$ ( $\pm$ 9168,22)	76700,00 $\beta$ ( $\pm$ 10627,35)	88,60 $\alpha$ ( $\pm$ 5,64)	65,00 $\beta$ ( $\pm$ 2,07)	80,25 $\alpha$ ( $\pm$ 1,50)	7,00 $\beta$ ( $\pm$ 3,54)	26,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,21)	3,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,86)	12,25 $\beta$ ( $\pm$ 3,94)	9,00 ( $\pm$ 5,55)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)	12,25 $\beta$ ( $\pm$ 3,94)	3,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,86)	9,00 ( $\pm$ 5,55)	8,55 ( $\pm$ 1,73)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
0,8	400	95500,00 $\alpha$ ( $\pm$ 13927,28)	64900,00 $\beta$ ( $\pm$ 10291,99)	83,80 $\alpha$ ( $\pm$ 4,44)	76,50 $\alpha$ ( $\pm$ 3,64)	79,50 $\alpha$ ( $\pm$ 2,90)	10,20 $\beta$ ( $\pm$ 2,59)	17,25 $\alpha$ ( $\pm$ 4,60)	4,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,96)	12,00 $\beta$ ( $\pm$ 3,30)	6,25 ( $\pm$ 3,09)	8,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,72)	12,00 $\beta$ ( $\pm$ 3,30)	4,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,96)	6,25 ( $\pm$ 3,09)	8,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,72)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
0,1	600	91500,00 $\alpha$ ( $\pm$ 13133,67)	82500,00 $\beta$ ( $\pm$ 5049,92)	84,00 $\alpha$ ( $\pm$ 4,64)	59,75 $\beta$ ( $\pm$ 7,56)	54,00 $\beta$ ( $\pm$ 3,44)	10,25 $\beta$ ( $\pm$ 1,48)	29,50 $\alpha$ ( $\pm$ 2,12)	5,50 $\beta$ ( $\pm$ 3,20)	29,50 $\alpha$ ( $\pm$ 1,50)	10,05 ( $\pm$ 6,73)	16,50 $\alpha$ ( $\pm$ 1,62)	29,50 $\alpha$ ( $\pm$ 1,50)	5,50 $\beta$ ( $\pm$ 3,20)	10,05 ( $\pm$ 6,73)	16,50 $\alpha$ ( $\pm$ 1,62)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
0,2	600	95375,00 $\alpha$ ( $\pm$ 17499,40)	75800,00 $\beta$ ( $\pm$ 11806,60)	87,80 $\alpha$ ( $\pm$ 5,07)	60,50 $\beta$ ( $\pm$ 5,12)	54,00 $\beta$ ( $\pm$ 2,69)	9,00 $\beta$ ( $\pm$ 2,83)	31,00 $\alpha$ ( $\pm$ 1,55)	2,80 $\beta$ ( $\pm$ 6,59)	31,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,01)	8,50 ( $\pm$ 5,66)	15,00 $\alpha$ ( $\pm$ 1,12)	31,00 $\alpha$ ( $\pm$ 1,55)	2,80 $\beta$ ( $\pm$ 6,59)	8,50 ( $\pm$ 5,66)	15,00 $\alpha$ ( $\pm$ 1,12)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
0,4	600	89000,00 $\alpha$ ( $\pm$ 9676,03)	75100,00 $\beta$ ( $\pm$ 10846,72)	86,00 $\alpha$ ( $\pm$ 6,12)	61,50 $\beta$ ( $\pm$ 3,50)	83,50 $\alpha$ ( $\pm$ 4,03)	9,60 $\beta$ ( $\pm$ 4,83)	28,00 $\alpha$ ( $\pm$ 3,05)	3,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,30)	8,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,80)	9,00 ( $\pm$ 5,79)	2,45 ( $\pm$ 2,45)	28,00 $\alpha$ ( $\pm$ 3,05)	3,80 $\beta$ ( $\pm$ 1,30)	9,00 ( $\pm$ 5,79)	2,45 ( $\pm$ 2,45)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
0,8	600	90125,00 $\alpha$ ( $\pm$ 9810,47)	66900,00 $\beta$ ( $\pm$ 16347,82)	82,80 $\alpha$ ( $\pm$ 3,56)	72,50 $\alpha$ ( $\pm$ 3,02)	81,75 $\alpha$ ( $\pm$ 2,68)	11,20 $\beta$ ( $\pm$ 2,69)	18,50 $\alpha$ ( $\pm$ 2,00)	5,00 $\beta$ ( $\pm$ 2,74)	9,00 $\beta$ ( $\pm$ 2,87)	8,75 ( $\pm$ 5,58)	9,25 $\beta$ ( $\pm$ 1,83)	18,50 $\alpha$ ( $\pm$ 2,00)	5,00 $\beta$ ( $\pm$ 2,74)	8,75 ( $\pm$ 5,58)	9,25 $\beta$ ( $\pm$ 1,83)	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
<sup>2</sup> Cont. vs Fat.		ns	0,05	ns	0,05	ns	ns	0,05	ns	0,05	ns	0,05	0,05	ns	0,05	ns	0,05	ns	ns	ns	ns	0,05	0,05
$\beta$ -Gluc <sup>3</sup>		ns	ns	ns	0,05	0,05	ns	0,05	ns	0,05	ns	ns	0,05	ns	0,05	ns	0,05	ns	ns	ns	ns	0,05	0,05
0,1		89637,50	79150,00	83,80	62,38	55,88	10,43	27,75	4,85	28,25	9,53	15,88	28,25	4,85	9,53	15,88	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
0,2		93250,00	76600,00	88,10	62,85	56,13	8,80	28,63	2,80	28,13	8,53	15,50	28,13	2,80	8,53	15,50	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
0,4		89562,50	75900,00	87,30	63,25	81,88	8,30	27,00	3,80	10,38	9,00	7,75	10,38	3,80	9,00	7,75	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
0,8		92812,50	65900,00	83,30	74,50	80,63	10,70	17,88	4,90	10,50	7,50	8,88	10,50	4,90	7,50	8,88	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
Vit C <sup>4</sup>		ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,05	ns	0,05	ns	ns	0,05	ns	0,05	ns	0,05	ns	ns	ns	ns	0,05	0,05
400		91131,25	73700,00	86,10	67,93	68,94	9,10	23,88	3,90	19,13	8,20	11,81	19,13	3,90	8,20	11,81	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
600		91500,00	75075,00	85,15	63,56	68,31	10,01	26,75	4,28	19,50	9,08	12,19	19,50	4,28	9,08	12,19	16,00 $\alpha$ ( $\pm$ 2,32)	7,50 $\beta$ ( $\pm$ 1,73)					
$\beta$ -Gluc x Vit C <sup>5</sup>		ns <sup>6</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	0,05	ns	0,05	ns	ns	0,05	ns	0,05	ns	0,05	ns	ns	ns	ns	0,05	0,05

<sup>1</sup> Letras minúsculas compararam os diferentes níveis de  $\beta$ -glucano dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras maiúsculas compararam diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de  $\beta$ -glucano; Letras gregas compararam um mesmo nível de  $\beta$ -glucano e vitamina C nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; <sup>2</sup> Controle (ausente de suplementação de  $\beta$ -glucano e 125,0 mg de vitamina C/kg dieta) vs Fatorial, nível P; <sup>3</sup> Efeito do  $\beta$ -glucano, nível P; <sup>4</sup> Efeito da vitamina C, nível P; <sup>5</sup> Interação entre  $\beta$ -glucano e vitamina C, nível P; <sup>6</sup> Não significativo (P>0,05).

Tabela 6. Valores médios e desvio-padrão inicial e final de intermediários reativos do oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e do nitrogênio (NO) produzidos por leucócitos sanguíneos de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de β-glucano (β-Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio e desafio com *Aeromonas hydrophila*<sup>1</sup>

		Estímulo pelo Frio						Desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i>					
β-Gluc (%)	Vit C (mg/kg)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NO		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NO		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NO	
		inicial nmol	final nmol	inicial μmol	final μmol	inicial nmol	final nmol	inicial μmol	final μmol	inicial nmol	final nmol	inicial μmol	final μmol
0	125	0,287α (±0,12)	0,035β (±0,01)	1,912α (±1,11)	0,632β (±0,14)	0,186 (±0,04)	1,912 (±1,11)	0,287 (±0,12)	0,035 (±0,01)	1,912 (±1,11)	0,632 (±0,14)	0,186 (±0,04)	1,912 (±1,11)
0,1	400	0,155α (±0,06)	0,083β (±0,02)	1,834 (±0,53)	1,365 (±0,21)	0,155β (±0,06)	1,834 (±0,53)	0,155β (±0,06)	0,083β (±0,02)	1,834 (±0,53)	1,365 (±0,21)	0,292αα (±0,02)	1,834 (±0,53)
0,2	400	0,133α (±0,03)	0,085β (±0,02)	2,302 (±2,21)	1,525 (±0,64)	0,133β (±0,03)	2,302 (±2,21)	0,133β (±0,03)	0,085β (±0,02)	2,302 (±2,21)	1,525 (±0,64)	0,294αα (±0,08)	2,302 (±2,21)
0,4	400	0,208α (±0,08)	0,080β (±0,02)	2,184 (±1,15)	1,677 (±0,71)	0,208 (±0,08)	2,184 (±1,15)	0,208 (±0,08)	0,080β (±0,02)	2,184 (±1,15)	1,677 (±0,71)	0,280a (±0,05)	2,184 (±1,15)
0,8	400	0,164α (±0,09)	0,062β (±0,03)	1,438 (±0,42)	1,466 (±0,53)	0,164 (±0,09)	1,438 (±0,42)	0,164 (±0,09)	0,062β (±0,03)	1,438 (±0,42)	1,466 (±0,53)	0,187b (±0,05)	1,438 (±0,42)
0,1	600	0,149α (±0,07)	0,097β (±0,04)	2,147 (±0,92)	1,752 (±0,80)	0,149β (±0,07)	2,147 (±0,92)	0,149β (±0,07)	0,097β (±0,04)	2,147 (±0,92)	1,752 (±0,80)	0,307αα (±0,09)	2,147 (±0,92)
0,2	600	0,144α (±0,05)	0,083β (±0,05)	1,228 (±0,91)	0,940 (±0,51)	0,144β (±0,05)	1,228 (±0,91)	0,144β (±0,05)	0,083β (±0,05)	1,228 (±0,91)	0,940 (±0,51)	0,222αα (±0,02)	1,228 (±0,91)
0,4	600	0,176α (±0,08)	0,068β (±0,02)	1,394 (±1,05)	0,998 (±0,49)	0,176 (±0,08)	1,394 (±1,05)	0,176 (±0,08)	0,068β (±0,02)	1,394 (±1,05)	0,998 (±0,49)	0,254a (±0,05)	1,394 (±1,05)
0,8	600	0,151α (±0,09)	0,070β (±0,06)	1,922 (±0,95)	1,067 (±0,37)	0,151 (±0,09)	1,922 (±0,95)	0,151 (±0,09)	0,070β (±0,06)	1,922 (±0,95)	1,067 (±0,37)	0,195b (±0,01)	1,922 (±0,95)
<sup>2</sup> Cont. vs Fat.		ns	0,05	ns	0,05	ns	0,05	ns	0,05	ns	0,05	ns	0,05
β-Gluc <sup>3</sup>		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
0,1		0,152	0,090	1,991	1,559	0,152	0,090	1,991	0,090	1,991	1,559	0,300	1,991
0,2		0,139	0,084	1,765	1,233	0,139	0,084	1,765	0,084	1,765	1,233	0,258	1,765
0,4		0,192	0,074	1,789	1,338	0,192	0,074	1,789	0,074	1,789	1,338	0,267	1,789
0,8		0,158	0,066	1,680	1,267	0,158	0,066	1,680	0,066	1,680	1,267	0,191	1,680
Vit C <sup>4</sup>		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
400		0,165	0,078	1,940	1,508	0,165	0,078	1,940	0,078	1,940	1,508	0,263	1,940
600		0,155	0,080	1,673	1,189	0,155	0,080	1,673	0,080	1,673	1,189	0,245	1,673
β-Gluc x Vit C <sup>5</sup>		ns <sup>6</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de β-glucano dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de β-glucano; Letras gregas comparam um mesmo nível de β-glucano e vitamina C nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; <sup>2</sup> Controle (ausente de suplementação de β-glucano e 125,0 mg de vitamina C/kg dieta) vs Fatorial, nível P; <sup>3</sup> Efeito do β-glucano, nível P; <sup>4</sup> Efeito da vitamina C, nível P; <sup>5</sup> Interação entre β-glucano e vitamina C, nível P; <sup>6</sup> Não significativo (P>0,05).

Tabela 7. Valores médios e desvio-padrão inicial e final de cortisol plasmático (Cortisol) e da concentração de vitamina C (Vit C) no fígado de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de  $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao estímulo pelo frio <sup>1</sup>

$\beta$ -Gluc (%)	Vit C (mg/kg)	Cortisol inicial (mg/dL)	Cortisol final (mg/dL)	Vit C inicial ( $\mu$ g/g)	Vit C final ( $\mu$ g/g)
0	125	4,16 $\beta$ ( $\pm$ 1,75)	14,30 $\alpha$ ( $\pm$ 2,10)	213,02 $\alpha$ ( $\pm$ 19,60)	20,46 $\beta$ ( $\pm$ 3,49)
0,1	400	5,71 ( $\pm$ 1,44)	3,17 ( $\pm$ 0,62)	308,79B $\alpha$ ( $\pm$ 92,10)	27,24B $\beta$ ( $\pm$ 2,21)
0,2	400	5,82 ( $\pm$ 0,98)	3,97 ( $\pm$ 0,70)	355,53B $\alpha$ ( $\pm$ 83,61)	29,01B $\beta$ ( $\pm$ 3,98)
0,4	400	5,13 ( $\pm$ 2,64)	5,94 ( $\pm$ 1,62)	328,96B $\alpha$ ( $\pm$ 61,74)	24,12B $\beta$ ( $\pm$ 3,45)
0,8	400	5,35 ( $\pm$ 1,79)	7,07 ( $\pm$ 3,96)	332,12B $\alpha$ ( $\pm$ 58,36)	27,82B $\beta$ ( $\pm$ 2,24)
0,1	600	5,56 ( $\pm$ 0,93)	2,99 ( $\pm$ 0,63)	520,27A $\alpha$ ( $\pm$ 51,77)	36,82A $\beta$ ( $\pm$ 3,83)
0,2	600	5,28 ( $\pm$ 0,50)	3,61 ( $\pm$ 0,79)	487,68A $\alpha$ ( $\pm$ 97,34)	35,40A $\beta$ ( $\pm$ 2,37)
0,4	600	5,94 ( $\pm$ 0,97)	6,35 ( $\pm$ 3,20)	513,99A $\alpha$ ( $\pm$ 72,46)	34,24A $\beta$ ( $\pm$ 2,54)
0,8	600	5,31 ( $\pm$ 2,30)	6,18 ( $\pm$ 3,45)	463,81A $\alpha$ ( $\pm$ 87,02)	33,91A $\beta$ ( $\pm$ 3,11)
<sup>2</sup> Cont. vs Fat.		ns	0,05	0,05	0,05
$\beta$ -Gluc <sup>3</sup>		ns	ns	ns	ns
		5,64	3,08	414,53	32,03
		5,55	4,79	421,61	32,21
		5,54	6,15	421,48	29,18
		5,33	6,63	397,97	30,87
Vit C <sup>4</sup>		ns	ns	0,05	0,05
		5,50	5,29	331,35	27,30
		5,52	5,03	496,44	35,09
$\beta$ -Gluc x Vit C <sup>5</sup>		ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de  $\beta$ -glucano dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de  $\beta$ -glucano; Letras gregas comparam um mesmo nível de  $\beta$ -glucano e vitamina C nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; <sup>2</sup> Controle (ausente de suplementação de  $\beta$ -glucano e 125,0 mg de vitamina C/kg dieta) vs Fatorial, nível P; <sup>3</sup> Efeito do  $\beta$ -glucano, nível P; <sup>4</sup> Efeito da vitamina C, nível P; <sup>5</sup> Interação entre  $\beta$ -glucano e vitamina C, nível P; <sup>6</sup> Não significativo (P>0,05).

Tabela 8. Mortalidade cumulativa e porcentagem de sobrevivência (SBV) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de  $\beta$ -glucano ( $\beta$ -Gluc) e vitamina C (Vit C) e submetidos ao desafio com *Aeromonas hydrophila*

$\beta$ -Gluc (%)	Vit C (mg/kg)	Mortalidade Cumulativa – dias após o desafio													SBV (%)
		1°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	Total	
0	125	0	0	1	2	2	3	4	6	6	7	7	7	7	41,67
0,1	400	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	3	75,00
0,2	400	0	0	0	0	0	1	2	2	2	3	3	3	3	75,00
0,4	400	0	0	0	0	0	1	2	2	3	3	3	3	3	75,00
0,8	400	0	0	0	0	1	3	3	4	5	5	5	5	5	58,33
0,1	600	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2	2	83,33
0,2	600	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	83,33
0,4	600	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	4	4	4	66,67
0,8	600	0	0	1	2	2	2	2	3	3	4	5	5	5	58,33

## **CAPÍTULO III**

**TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO DE  $\beta$ -GLUCANO E VITAMINA C PARA  
TILÁPIA DO NILO: PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS**



## TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO DE $\beta$ -GLUCANO E VITAMINA C PARA TILÁPIA DO NILO: PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS

**Resumo:** O imunestimulante pode determinar respostas tanto positivas quanto negativas para o sistema imune, dependendo da concentração e do tempo de administração. Desta forma, esta pesquisa teve por objetivo determinar o melhor tempo de administração da dieta suplementada com 0,1%  $\beta$ -glucano e 600,0 mg de vit C/kg da dieta (dieta teste) para juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, por meio das respostas hematológicas e imunológicas (determinação de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio), após os peixes serem submetidos ao estímulo pelo frio, estresse por transporte e desafio com *Aeromonas hydrophila*. Foram avaliados quatro períodos de administração dessa dieta: 45; 30; 15 e sete dias que antecederam os desafios. Para tal, um lote de 288 alevinos de tilápia do Nilo, com peso médio de  $5,0 \pm 0,23$ g recebeu a dieta controle (0,0%  $\beta$ -glucano/125,0 mg vit C/kg) até atingir peso médio de  $30,0 \pm 1,12$  g, para então iniciar o período experimental. No tratamento I os peixes receberam a dieta teste por 45 dias. No tratamento II os peixes receberam a dieta controle por 15 dias e a dieta teste por 30 dias; no tratamento III a dieta controle foi administrada por 30 dias e a teste por 15 dias e no tratamento IV os mesmos receberam 38 dias de dieta controle e sete dias a dieta teste, para posteriormente serem submetidos aos desafios. Os resultados permitem concluir que a alimentação com 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta durante 15 dias ou mais proporcionou aumento da resistência orgânica dos peixes frente os desafios e, que, o fornecimento dessa dieta durante sete dias não foi suficiente para manter e/ou proporcionar adequada resposta após juvenis de tilápia do Nilo serem submetidos a situações adversas.

Palavras chave:  $\beta$ -glucano, vitamina C, estresse, transporte, *Aeromonas hydrophila*

**PERIOD OF  $\beta$ -GLUCAN AND VITAMIN C ADMINISTRATION FOR NILE  
TILAPIA: PHISIOPATHOLOGICAL PARAMETERS**

**Abstract:** Immunoestimulant can determine either positive or negative answer for the immune system depending on the concentration and administration period. Thus this research was conducted to determine the best administration period for diet supplemented with 0.1% of  $\beta$ -glucan and 600.0 mg of vit C/kg diet for Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus*, using hematological and immunological (reactive oxygen and nitrogen intermediates) responses after fish were submitted to cold and transportation stress, and challenged with *Aeromonas hydrophila*. Four periods of diet administration: 45; 30; 15 and 7 days, preceding stress, were evaluated. Two hundred and eighty eight Nile tilapia fingerlings, average weight  $5.0 \pm 1.12$  g, were fed control diet until they reached  $30.0 \pm 1.12$  g to begin the experimental period. In treatment 1 fish were fed test diet for 45 days. In treatment 2 fish were fed control diet for 15 days and test diet for 30 days; in treatment 3 control diet was given for 30 days and test for 15 days and in treatment 4 fish were fed for 38 days with control diet and seven with test diet. Afterwards they were submitted to stress. It was concluded that 15 days of diet supplemented with 0.1% of  $\beta$ -glucan and 600.0 mg of vit C/kg diet increased organic fish resistance submitted to stress and that the period of seven days was not enough to keep or yield appropriate answer for Nile tilapia juvenile under adverse circumstances.

Key words:  $\beta$ -glucan, vitamin C, stress, transportation, *Aeromonas hydrophila*

## Introdução

Com a intensificação do sistema de produção de peixes diferentes fatores estressores se apresentam, sendo essencial que os mecanismos de defesa funcionem adequadamente para garantir a higidez e as condições fisiológicas dos peixes cultivados (Urbinati e Carneiro, 2004). Esses fatores podem compreender desde a qualidade da água, mudanças bruscas de temperatura, densidade de estocagem, manejo de captura e despesca e ainda transporte, alterando direta ou indiretamente a resistência orgânica dos peixes (Lim et al., 2005). Como resultado do estresse pode-se descrever a contínua perda da homeostase, com redução do crescimento e da capacidade reprodutiva, além da supressão da resposta imune, tornando o peixe susceptível a doenças e a morte (Wendelaar-Bonga, 1997; Van Weerd e Komen, 1998).

Atualmente, a indústria aquícola aumentou o interesse nas formas de tratamentos e de profilaxia de doenças desencadeadas por fatores estressores, principalmente com o emprego de vacinas e na utilização de imunostimulantes. A vacinação é um método alternativo de profilaxia que pode ser utilizada em larga escala, porém, a diversidade de patógenos e de espécies de peixes não permite assegurar que as mesmas sejam eficazes nas diferentes situações de risco que a produção intensiva de peixes proporciona. Somado a isto, existe a necessidade de programa específico de vacinação que abrange conhecimento, por parte dos produtores, sobre doenças, sistema imunológico e farmacologia (Burrells et al., 2001; Belém-Costa, 2003; Pilarski, 2006).

A utilização de imunostimulantes em dietas se apresenta como estratégia para melhorar as respostas de defesa contra as adversidades a que os peixes estão expostos, somado a necessidade de se encontrar alternativas para a diminuição do uso de antibióticos e quimioterápicos para o tratamento de doenças em peixes. Isto ocorre em função do aumento da resistência dos patógenos a vários antibióticos e o possível resíduo destes no filé para consumo humano, levando ao fim do uso desses medicamentos em diversos países (Anderson, 1992; FAO, 2002; Patterson e Burkholder, 2003).

Dentre os imunostimulantes, o  $\beta$ -glucano se destaca, sendo um dos principais polissacarídeos encontrados na parede celular de leveduras, fungos filamentosos e cogumelos. O  $\beta$ -glucano proveniente da parede celular da levedura, *Saccharomyces*

*cerevisae*, tem despertado interesse na aquicultura por ser produzido na natureza, por não deixar resíduo no produto industrializado e por não prejudicar a qualidade da água de cultivo (Robertsen et al., 1994). Sua utilização tem demonstrado melhorar a atividade do sistema imune não específico e a resistência contra certos patógenos, por meio do aumento da concentração plasmática de lisozima e de complemento, incrementando ainda a atividade fagocítica dos macrófagos em diversas espécies de peixes (Nikl et al., 1991; Yano et al., 1991; Anderson, 1992; Chen e Ainsworth, 1992; Robertsen et al., 1994; Galeotti, 1998; Sakai, 1999).

O aparecimento de patógenos nos sistema intensivo de criação está diretamente relacionado às condições de estresse a que os peixes estão expostos. Conseqüentemente, inúmeras doenças ocorrem, principalmente, por parasitos, fungos, vírus e bactérias. Dentre estas, destacam-se as bactérias oportunistas, como a *Aeromonas hydrophila* (Belém-Costa, 2003), as quais podem, em casos de estresse, levar os peixes à morte (Shama et al., 2000). Pesquisas também têm demonstrado ação positiva do  $\beta$ -glucano sobre o sistema imune não específico, especificamente contra a bactéria *A. hydrophila* (Kwak et al., 2003; Selvaraj et al., 2005; Misra et al., 2006).

Entretanto, informações sobre o período de administração do  $\beta$ -glucano suplementado em dietas para peixes são escassas. Desta forma, esta pesquisa teve por objetivo determinar o melhor tempo de administração do  $\beta$ -glucano e vitamina C suplementados em dietas para tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, avaliado por meio do estímulo pelo frio e estresse por transporte, além do desafio com *Aeromonas hydrophila*.

### **Material e Métodos**

Este estudo foi conduzido na Unesp – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, Câmpus de Botucatu, unidade integrada ao CAUNESP.

### *Período de alimentação*

Foram avaliados quatro períodos de administração da dieta teste: 45; 30; 15 e sete dias que antecederam ao estímulo pelo frio, estresse por transporte e desafio com *Aeromonas hydrophila*. Para tal, um lote de 288 alevinos de tilápia do Nilo, com peso médio de  $5,0 \pm 0,23$ g recebeu a dieta controle (0,0%  $\beta$ -glucano/125,0 mg vit C), até atingir peso médio de  $30,0 \pm 1,12$  g, para então iniciar o período experimental.

No tratamento I os peixes receberam a dieta teste (0,1%  $\beta$ -glucano/600,0 mg vit C) por 45 dias. No tratamento II os peixes receberam a dieta controle por 15 dias e a dieta teste por 30 dias; no tratamento III a dieta controle foi administrada por 30 dias e a teste por 15 dias e no tratamento IV os mesmos receberam 38 dias de dieta controle e sete dias a dieta teste, para posteriormente serem submetidos ao estímulo pelo frio, estresse por transporte e desafio com *A. hydrophila*.

### *Formulação e confecção das rações*

As rações foram formuladas com base nos dados apresentados no NRC (1993) e nos valores de digestibilidade aparente de aminoácidos (Furuya et al., 2004) e disponibilidade de minerais de Pezzato et al. (2004). Foram confeccionadas duas dietas práticas isoaminoacídicas formuladas para 28,0% de proteína digestível e 3000 kcal de energia digestível/kg. Foram suplementados os aminoácidos lisina, metionina, triptofano e treonina. O  $\beta$ -glucano e a vitamina C foram adicionados em substituição ao amido de milho. A dieta controle era isenta da suplementação de  $\beta$ -glucano e suplementada com 125,0 mg/kg de vitamina C e a dieta teste foi suplementada com 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0 mg/kg de vitamina C. O percentual dos ingredientes e a composição químico-bromatológica das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 1.

O suplemento vitamínico e mineral adicionado era isento de vitamina C, especialmente confeccionado para a pesquisa, sendo considerado como fonte somente o adicionado à dieta. A vitamina C utilizada foi a L-ascorbato-2-monofosfato com 35,0% de atividade (Stay-C Roche®). O  $\beta$ -glucano utilizado foi o GC-Goldcell® (85,0%) obtido a partir da parede celular de levedura *Saccharomices cerevisae*.

Para o preparo das dietas, os ingredientes foram moídos em partículas menores que 0,7 mm e homogeneizados em misturador automático. A mistura foi processada em extrusora Extrutech<sup>®</sup>. As duas dietas foram secas em estufa de circulação de ar forçada, a 55,0°C, durante 24 horas. Os peletes foram fracionados de acordo com o tamanho dos peixes e posteriormente armazenados a -20,0°C. Foram realizadas análises de vitamina C da dieta no Laboratório de Alta Tecnologia – Labtec – Campinas/SP.

#### *Estímulo pelo frio*

Após o período de preparo, 96 peixes foram transferidos para a sala experimental de estímulo pelo frio contendo 24 aquários, na densidade de quatro peixes por aquário. O estímulo pelo frio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos (quatro períodos de administração da dieta teste: 45; 30; 15 e sete dias que antecederam o estímulo) e seis repetições. Os aquários, de 40 litros cada, apresentavam filtros individualizados, aquecedores e aeração. A temperatura da água dos aquários foi reduzida gradativamente do conforto térmico para a espécie ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) para  $14,0^\circ\text{C}$ , permanecendo nessa temperatura durante sete dias. Todos os peixes, independentemente do tratamento, receberam a dieta teste suplementada com 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0mg de vitamina C/kg, variando apenas o tempo de administração. Ao final, foram determinados parâmetros hematológicos e imunológicos (determinação de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio).

#### *Estresse por transporte*

Após o período inicial de preparo, um lote 96 peixes foi transferido para quatro aquários de 250,0 L cada, dotados de sistema de aquecimento controlado por termostato, filtro mecânico e biológico. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente nos quatro aquários em densidade de 24 peixes por aquário. O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos dispostos em cada aquário, sendo que cada peixe foi considerado uma repetição.

Posterior aos períodos de administração da dieta teste, o estresse por transporte foi efetuado pelo período de quatro horas. Foram utilizados 24 peixes por tratamento, acondicionados em quatro caixas próprias para transporte com capacidade de 100 L cada. Para melhor determinar a ação do imunostimulante e da suplementação com vitamina C nenhum produto foi adicionado à água de transporte. Foram checados a cada hora a temperatura, a concentração de oxigênio dissolvido, o pH e a concentração de amônia não ionizada da água da caixa de transporte. Foram determinados antes do estresse (inicial), após (final), depois de 24 e 72 horas do estresse os mesmos parâmetros hematológicos e imunológicos avaliados no estímulo pelo frio, além das concentrações de cloreto (Kits Labtest<sup>®</sup>) e amônia plasmática (Gentzkow e Masen, 1942). Para as análises de sódio e potássio, o sangue foi coletado sem anti-coagulante e centrifugado para separação do soro, que foi congelado e armazenado a -20°C, para posterior análise em fotômetro de chama (FC 180 Celm).

#### *Desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila**

Após esse período de preparo, o lote restante de 96 peixes foi transferido para a sala experimental de desafio contendo 24 aquários, na densidade de quatro peixes por aquário. O desafio por bactéria foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos e seis repetições, mesma estrutura do estímulo pelo frio.

A cepa de bactéria utilizada foi fornecida pelo Laboratório de Patologia de Peixes, CAUNESP, Câmpus de Jaboticabal. A viabilidade e pureza da bactéria foram confirmadas na Unesp – Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Câmpus de Botucatu.

Para a determinação do inóculo a ser utilizado no desafio experimental, três grupos de 25 peixes cada, foram infectados com diferentes concentrações de *Aeromonas hydrophila* ( $10^4$ ;  $10^6$  e  $10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>), visando a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes testados (DL<sub>50</sub>), de acordo com metodologia proposta por Plumb e Bowser (1983).

Determinada a DL<sub>50</sub> e após finalização do estímulo pelo frio, os peixes foram infectados com *A. hydrophila* por meio de inoculação intraperitoneal com a concentração

determinada ( $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>) do agente patógeno em 0,1 mL de solução salina (0,85%). Os peixes receberam também uma injeção de dexametasona (0,04mL/100g peso vivo) visando diminuir a resistência dos animais e a facilitação da ação da bactéria. A avaliação da mortalidade foi efetuada duas vezes ao dia, juntamente com a alimentação. Ao final desse período foram determinados parâmetros hematológicos, imunológicos e a taxa de sobrevivência.

#### *Análises hematológicas*

Para a determinação do perfil hematológico foram utilizados oito peixes por tratamento. Os mesmos foram anestesiados com benzocaína (1,0 g/15 L) e o sangue coletado com auxílio de seringa de 1,0 mL com anticoagulante (EDTA 3,0%) por meio da punção do vaso caudal. A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada pelo método do hemocitômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se o azul de toluidina a 0,01% em pipeta de Thoma como solução diluente e corante.

A diferenciação dos leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas com May-Grünwald Giemsa. A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se “kit” de determinação fotolorimétrica (Analisa Diagnóstica<sup>®</sup>). O hematócrito foi obtido utilizando-se centrífuga para microhematócrito em 5000 rpm durante cinco minutos. A proteína plasmática total foi determinada por meio de refratômetro manual de Goldenberg. A análise de albumina sérica foi efetuada utilizando-se “kit” de análise (Analisa Diagnóstica<sup>®</sup>) e as globulinas determinadas por cálculo diferencial. Após a determinação das concentrações de albumina e globulina foi calculada a relação albumina:globulina (A:G). As variáveis acima apresentadas foram avaliadas segundo as técnicas descritas por Jain (1986).

As análises da concentração de cortisol plasmático foram realizadas na Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução, Câmpus de Botucatu pelo método radioimunoensaio utilizando-se kit DPC – Diagnostic Products Corporation<sup>®</sup> (coat-a-count, fase sólida) e as análises de glicose, foram realizadas utilizando-se glicosímetro manual (Roche<sup>®</sup>).



*Parâmetros imunológicos (intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio)*

Para a determinação dos parâmetros imunológicos (intermediários reativos do oxigênio – IRO e do nitrogênio – IRN), foi coletado o sangue de seis peixes de cada tratamento conforme procedimento descrito para as análises hematológicas. Após a coleta do sangue, o mesmo foi colocado em tubos ependorfe (1,5 mL) e levados para câmara asséptica de fluxo laminar, modelo PCR 2.5 – Pachane<sup>®</sup>. Posteriormente, foi transferido com auxílio de pipetador automático, para tubos Falcon estéreis contendo 7,0 mL de meio completo para cultura de células (meio Leibowitz L-15 suplementado com 2,0% de soro bovino fetal, 2,0 mM de glutamina e gentamicina) e homogeneizado, sendo os tubos mantidos em banho de gelo. Em outro tubo Falcon foram colocados, lentamente pela parede do tubo, 3,0 mL de Percoll 51,0 e 34,0%, respectivamente. O sangue foi então transferido lentamente para o gradiente de percoll, sendo, em seguida, centrifugado a 1200 rpm, por 20 minutos, a 10,0° C.

Decorrido este período, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 15,0 mL de L-15 e, centrifugados a 1000 rpm, por 10 minutos, a 10,0°C. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. Em seguida, as células foram ressuspensas para 1,0 mL de meio L-15 contendo 0,1% de soro bovino fetal, sendo a concentração ajustada para  $2,0 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>.

Alíquotas de 100 µL destas suspensões foram distribuídas em placas de microcultura, com posterior incubação (18,0°C). Decorridas duas horas, as células não-aderentes foram removidas e a monocamada de leucócitos incubada (18,0°C) por 24 horas, com a presença ou não de PMA (phorbol miristate acetate). O protocolo adotado foi adaptado descrito por Secombes (1990).

A produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por leucócitos sanguíneos de tilápia do Nilo, *Oreochromius niloticus*, foi determinada por meio da microtécnica de oxidação do vermelho fenol (Pick e Mizel, 1981). Após a incubação das culturas celulares por 24 horas, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de óxido nítrico e as células utilizadas para a determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As células foram ressuspensas ao volume original (100 µL) em solução vermelho fenol, contendo 140,0 mM de NaCl, 10,0 mM de tampão fosfato de

potássio pH 7,0; 5,5 mM de dextrose de raiz forte tipo II (0,01 mg/mL). As culturas foram novamente incubadas em estufa a 18,0°C, por 120 minutos. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 10,0 µL de NaOH 1N.

A absorbância foi determinada em microleitor de Elisa automático, com filtro de 620 nM, sendo o branco constituído de vermelho fenol e NaOH. Os resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2,0x10<sup>5</sup> células, a partir da curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão vermelho fenol.

A produção de NO por leucócitos sanguíneos da tilápia do Nilo foi determinada por método colorimétrico, baseado na reação de Griess (Green et al., 1981), combinando 100 µL do sobrenadante da amostra teste com 100,0 µL do reagente Griess (Need 0,1% e sulfanilamida 1,0% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5,0%).

As leituras foram efetuadas em microleitor de Elisa, utilizando filtro de 540nm. Os resultados foram expressos em µmoles de NO/2,0x10<sup>5</sup> células, comparando-se a densidade óptica com a curva padrão de NO<sub>2</sub>, realizada em cada experimento.

#### *Análise estatística*

Os resultados desse estudo foram avaliados por meio da técnica da análise de variância multivariada considerando os perfis médios de resposta e, quando significativo, foi complementado com os intervalos dos contrastes de médias por Hotelling (Johnson e Wichern, 1998), para comparação dos momentos anterior e posterior ao desafio. Utilizou-se também a técnica da análise de variância para o modelo do experimento inteiramente casualizado, complementada com o teste de comparações de Tukey (Zar, 1999). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do pacote computacional SAS, ao nível de 5,0% de significância.

## Resultados

### *Estímulo pelo frio*

Após o estímulo pelo frio, os peixes dos tratamentos que receberam a dieta teste por diferentes dias não apresentaram diferença significativa nos parâmetros hematológicos. Entretanto, pode-se observar tendência de queda no número de eritrócitos e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), além do aumento da porcentagem de hematócrito (Htc) e volume corpuscular médio (VCM) nos peixes que receberam a dieta teste por sete dias em relação aos peixes dos demais tratamentos (Tabela 2).

Os diferentes períodos de alimentação não determinaram efeito significativo na proteína plasmática total (PPT) e na relação albumina:globulina (A:G). Igualmente, a alimentação por sete dias com a dieta teste apresentou, de forma não significativa, maior A:G, com menor concentração de globulinas (Tabela 2).

Verificou-se diferença significativa da concentração de cortisol plasmático nos peixes dos tratamentos alimentados por 45, 30 e 15 dias com a dieta teste em relação aos peixes que receberam a dieta por sete dias, sendo que este período de alimentação determinou maior concentração de cortisol plasmático. Não foi observado efeito significativo para a concentração de glicose plasmática (Tabela 2).

Houve diferença significativa para a contagem total de leucócitos, sendo que os peixes alimentados por 45, 30 e 15 dias com a dieta teste apresentaram maior número de leucócitos e, os peixes alimentados por sete dias a menor. A contagem diferencial de leucócitos não apresentou diferença significativa.

Em relação aos parâmetros imunológicos avaliados, intermediários reativos do oxigênio ( $H_2O_2$ ) e nitrogênio (NO) produzidos por leucócitos sanguíneos, não foi observada diferença significativa nos peixes alimentados com a dieta teste, por diferentes dias; porém, houve tendência de queda nos valores para os peixes alimentados por sete dias (Tabela 2).

### *Desafio com a bactéria Aeromonas hydrophila*

Não foi observada diferença significativa do tempo de alimentação no perfil hematológico e nos valores hematimétricos dos peixes dos diferentes tratamentos após o desafio com *Aeromonas hydrophila* (Tabela 3).

Igualmente, não houve diferença significativa para PPT, relação A:G, contagem total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos (Tabela 3). Entretanto, observou-se para esses parâmetros diminuição dos valores nos peixes alimentados com a dieta teste por sete dias, ressaltando que a relação A:G, apesar de ter apresentado maior valor para esse tratamento, apresentou redução ( $P < 0,05$ ) na concentração de globulina.

Para os parâmetros imunológicos avaliados, intermediários reativos do oxigênio ( $H_2O_2$ ) e nitrogênio (NO), não foi observado diferença significativa dos diferentes períodos de alimentação com a dieta teste. Porém, verificou-se menor produção dos intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio nos peixes alimentados com a dieta teste por sete dias (Tabela 3).

Durante o desafio com a *A. hydrophila* foi quantificada a mortalidade cumulativa (Tabela 4). Observou-se que a menor porcentagem de sobrevivência ocorreu nos peixes alimentados por sete dias com a dieta teste, sendo em média 28,26% inferior aos demais. Ressalta-se ainda que, no oitavo dia do desafio, foi observada a morte de aproximadamente 50,0% do total de peixes, deste tratamento.

### *Estresse por transporte*

As concentrações de amônia não ionizada ( $NH_3$ ) e pH da água durante o transporte estão apresentadas na Figura 1. Observou-se diminuição do pH e aumento da concentração de amônia durante o transporte, sendo que a temperatura da água manteve-se a  $23,2 \pm 0,3^\circ C$  e o oxigênio dissolvido ( $O_2D$ ) em  $4,82 \pm 0,44$  mg/L.

Ao final do estresse por transporte, os peixes alimentados com a dieta teste durante 45, 30 e 15 dias apresentaram valores inferiores ( $P < 0,05$ ) para número de eritrócitos e taxa de Hb em relação aos peixes alimentados por sete dias (Tabela 5). Embora não de forma

significativa, observou-se tendência de aumento do Htc e CHCM e diminuição do VCM após o transporte nos peixes desse tratamento comparado aos demais.

Confrontando-se os momentos inicial (I), final (F), 24h e 72h após o final do transporte, observou-se aumento significativo para número de eritrócitos, Hb e CHCM nos peixes que receberam a dieta teste por sete dias, retornando gradativamente aos valores do período inicial em 72 horas (Tabela 5). Ressalta-se que o aumento desses parâmetros após o transporte também ocorreu em todos os tratamentos, de forma não significativa.

O fornecimento da dieta teste por diferentes períodos não determinou diferença para a PPT e relação A:G. Entretanto, observou-se menor concentração de globulina e, conseqüentemente, maior relação A:G nos peixes alimentados com a dieta teste durante sete dias em relação aos peixes dos outros tratamentos nos diferentes momentos (Tabela 6).

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para a contagem total e diferencial de leucócitos; porém, os peixes alimentados durante sete dias com a dieta teste apresentaram menor número de leucócitos totais após o transporte. Comparando-se os momentos, observou-se, após o estresse por transporte, leucopenia, linfopenia e neutrofilia nos peixes de todos os tratamentos, retornando aos valores iniciais após 24 horas do término do transporte. Entretanto, os peixes alimentados com a dieta teste durante sete dias recuperaram a condição pré-transporte somente após 72 horas (Tabela 6).

Verificou-se após o transporte diferença significativa da concentração de cortisol plasmático nos peixes alimentados com a dieta teste durante 45, 30 e 15 dias, em relação aos peixes alimentados por sete dias, sendo que este tratamento determinou maior concentração do hormônio ao final, 24 e 72 horas após o estresse por transporte. Observou-se efeito significativo de momento para cortisol e glicose plasmática em todos os tratamentos, com aumento da concentração desses parâmetros após o transporte. Os peixes retornaram aos valores iniciais depois de 72 horas para cortisol plasmático e 24 horas para glicose plasmática, com exceção dos peixes alimentados durante sete dias com a dieta teste em relação ao cortisol plasmático, os quais não retornaram aos valores iniciais até 72 horas depois do transporte (Tabela 7).

Os níveis séricos de sódio e potássio não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos em nenhum momento, assim como os níveis plasmáticos de cloreto e amônia (Tabela 8). Quando da avaliação de momento, observou-se diferença significativa

com aumento do potássio sérico e diminuição do cloreto plasmático após o transporte para todos os tratamentos, tendo ambos retornados aos valores iniciais 24 horas após o final do transporte. Observou-se, embora de maneira não significativa, diminuição do nível sérico de sódio e aumento da amônia plasmática após o transporte, em todos os tratamentos.

### Discussão

O aumento da susceptibilidade dos peixes a doenças é decorrente da imunossupressão causada por estresse associado à intensificação dos sistemas de produção, representado principalmente pelo manejo adotado e por fatores ambientais desfavoráveis (Selvaraj et al., 2005). O efeito nocivo das condições adversas sobre a higidez dos peixes pôde ser observado nesta pesquisa com resultados de alterações fisiológicas.

Peixes submetidos ao estímulo pelo frio apresentaram valores hematológicos alterados, sendo que a dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vitamina C não foi capaz de manter a eritropoiese nos padrões considerados adequados para animais sadios (Feldman et al., 2000; Barros et al., 2006). Nos peixes alimentados com a dieta teste por sete dias, embora a diferença não seja significativa, apresentaram seus parâmetros hematológicos aquém dos verificados nos peixes alimentados por maior período. A maior porcentagem de Htc, menor taxa de Hb e menor CHCM, além do maior VCM nos peixes deste tratamento, caracterizaram animais anêmicos e evidenciaram a necessidade de maior período de alimentação com a dieta teste na tentativa de se manter os parâmetros hematológicos, após os desafios, em níveis próximos aos considerados adequados para peixes hígidos.

Os valores do hemograma dos peixes submetidos ao estímulo pelo frio caracterizaram que a temperatura de 14,0°C foi mais prejudicial à manutenção do perfil hematológico do que a infecção com *Aeromonas hydrophila*. Talvez, em condições mais prolongadas desse tipo de desafio fossem determinadas também alterações no eritrograma e não só no leucograma, conforme esperado e observado.

A nocividade da baixa temperatura no eritrograma, como relatado neste estudo, também foi descrita por outros autores, com alterações principalmente na porcentagem de hematócrito, em função da hemoconcentração ou hemodiluição (Chen et al., 1995; McDonald e Milligan, 1997). Embora não tenham sido observadas nesta pesquisa, a

literatura descreve alterações significativas no eritrograma do matrinxã, *Brycon amazonicus*, após infecção por *A. hydrophila* quando alimentados com dietas suplementadas com vitamina C (Alves de Andrade et al., 2006) e na carpa comum, *Cyprinus carpio*, infectadas também com *A. hydrophila* (Harikrishnan et al., 2003).

Os peixes submetidos ao estresse por transporte também apresentaram alterações hematológicas. O aumento do número de eritrócitos, da taxa de hemoglobina e CHCM, imediatamente após o estresse, sugerem maior demanda de oxigênio pelo organismo, condição esta que ocorre normalmente em situações adversas (Carneiro, 2001). Esses aumentos, embora de maneira não significativa, foram observados nos peixes de todos os tratamentos. Contudo, os peixes alimentados por sete dias com a dieta teste apresentaram maior número de eritrócitos e maior taxa de Hb em relação aos peixes dos demais tratamentos, demonstrando, possivelmente, estarem sendo mais exigidos fisiologicamente que os demais e até este momento, respondendo a esta demanda. A concentração plasmática de cortisol desses peixes suporta esta hipótese.

A ausência de elevada concentração de cortisol plasmático após o desafio pelo frio talvez tenha ocorrido em virtude da duração do agente estressor (sete dias), com conseqüente perda do pico. Entretanto, após o estresse por transporte foi possível observar diferença significativa da concentração de cortisol plasmático nos peixes de todos os tratamentos. Vale ressaltar que os peixes alimentados com a dieta teste por sete dias, além de apresentarem maior concentração deste corticóide, não retornaram aos níveis iniciais até 72 horas após o final do transporte. Estes resultados corroboram com a hipótese de que os peixes alimentados com a dieta teste por menos tempo, apresentaram menor resistência orgânica depois dos desafios em relação aos peixes que foram alimentados por maior período.

Níveis elevados de cortisol após estresse por transporte foram observados em salmão do Atlântico, *Salmo salar*, e em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, tendo esses níveis plasmáticos retornados aos parâmetros iniciais após alguns dias (Iversen et al., 1998). Resultados similares foram descritos por Carneiro (2001) que observou elevação significativa nos níveis de cortisol após o transporte de matrinxã, retornando aos níveis iniciais 24 horas após o desafio. O efeito da temperatura e do transporte alterando a fisiologia dos peixes foi ainda relatado por Bly e Clem, (1992), os quais enfatizaram que

mudanças bruscas de temperatura e o transporte desencadeiam respostas primárias e secundárias na tentativa da manutenção da homeostase.

Igualmente ao ocorrido para o cortisol plasmático não foi possível determinar alterações nos níveis glicêmicos após o estímulo pelo frio, provavelmente, em virtude da duração do estímulo estressor. Porém, ao final do estresse por transporte, a elevação da concentração plasmática de glicose foi observada nos peixes de todos os tratamentos, retornando aos valores iniciais em 24 horas. A alteração da concentração de glicose relacionada com a duração do estímulo foi relatada por Barton (2000) que destacou que a concentração de glicose plasmática aumenta durante períodos curtos, para suprir a maior demanda energética em situações de estresse. Respostas semelhantes às determinadas neste estudo foram observadas em matrinxã e tambaqui, *Colossoma macropomum*, após serem submetidos ao estresse por transporte (Carneiro e Urbinati, 2002; Gomes et al., 2003; Urbinati et al., 2004).

A relação entre o nível de suplementação dietária de vitamina C e a concentração plasmática de cortisol ainda não está fundamentada. Pesquisas têm relatado tanto correlação inversa quanto a ausência de efeito (Li et al., 1998; Ortuno et al. (2002). Entretanto, a suplementação de vitamina C em níveis acima da exigência para crescimento, pode proporcionar reserva necessária para sua redistribuição e utilização pelo organismo, promovendo melhora das respostas fisiológicas contra estresse e infecções (Lim et al., 2001), sendo que a concentração desta vitamina no fígado dos peixes diminui drasticamente em situações de estresse, necessitando dessa maneira, adequada reserva para enfrentar situações adversas (Li e Robinson, 1994; Falcon, 2004).

Desta forma, pode-se supor que os peixes deste estudo alimentados com a dieta teste por sete dias não apresentavam a mesma reserva de vitamina C no organismo que os peixes alimentados durante 45, 30 e 15 dias. O pico de reserva de vitamina C no fígado de *Clarias batrachus* alimentados com dietas suplementadas com 500,0 mg/kg na dieta ocorreu somente após 30 dias de alimentação, conforme relatado por Kumari e Sahoo (2005). Dessa maneira, a maior reserva, provavelmente, contribuiu para que os peixes alimentados por mais de sete dias com a dieta teste apresentassem adequado perfil hematológico após os desafios, com menor concentração de cortisol plasmático, propiciando, portanto, maior resistência orgânica. Soma-se a esta hipótese o fato de que o menor tempo de alimentação



com o  $\beta$ -glucano, pode ter influenciado ainda a porcentagem de sobrevivência dos peixes após o desafio por bactéria.

Alterações no leucograma de peixes submetidos a estresse com comprometimento da resistência orgânica têm sido relatadas. A leucopenia, observada nos peixes desta pesquisa, após os desafios, foi anteriormente reportada por Barton e Iwana (1991). Estes autores ressaltaram ainda que, em condições de estresse, esta queda na produção total de células brancas foi acompanhada por linfopenia. Este quadro foi igualmente observado nos peixes submetidos aos diferentes desafios, tendo como referência, o número total de leucócitos e as porcentagens iniciais de linfócitos do estresse por transporte.

A redução do número de linfócitos circulantes pode representar importante ligação entre a resposta ao estresse e o surgimento de doenças, devido a elevação do nível plasmático de cortisol (Pickering e Pottinger, 1985). Alterações como linfopenia e neutrofilia, associadas às situações de estresse por baixa temperatura e infecções bacterianas, foram descritas por Englesma (2002) e Martins et al. (2004) e por Urbinati e Carneiro (2004) em peixes submetidos ao transporte.

Neste estudo, a avaliação do leucograma dos peixes mostrou que após os desafios ocorreu maior produção de células fagocíticas como neutrófilos e monócitos, relacionadas à eliminação de microorganismos invasores, predominantemente nos peixes alimentados por mais de sete dias com a dieta teste. Considerando-se a recuperação e/ou manutenção da homeostase orgânica, observou-se que os peixes alimentados por sete dias com a dieta teste e submetidos ao estresse por transporte necessitaram de mais tempo para a recuperação dos parâmetros leucocitários. Novamente, ficou evidenciado a menor resistência dos peixes deste tratamento em relação aos demais.

O comprometimento da resistência orgânica em peixes sob condições de estresse tem sido também avaliado por meio da concentração de proteína plasmática. Observou-se, nesta pesquisa, aumento na concentração da PPT ao final do desafio por transporte, concentração essa, similar ao determinado após o desafio com *A. hydrophila*. Este aumento pode ser explicado se considerado o aumento do nível plasmático de cortisol, observado ao final do estresse por transporte e, o aumento da concentração de globulinas, verificado após o estresse por bactéria, tendo como referência os valores iniciais de globulinas do transporte.

O aumento da PPT após estresse por confinamento em tilápia do Nilo e transporte em matrinxã, foi associado à diminuição dos processos anabólicos, com aumento da mobilização de aminoácidos para os processos gliconeogênicos (Nolan et al., 1999; Carneiro, 2001). Igualmente, Van der Boon et al. (1991) relataram que a elevação da PPT após o estresse por transporte pode estar relacionada com a influência do aumento do cortisol plasmático sobre o metabolismo protéico. A severidade e o longo período do estímulo pelo frio causaram redução na PPT dos peixes no presente estudo. Esta queda também foi relatada por Hrubec et al. (2000) e Tort et al. (1998) igualmente em temperaturas baixas.

O aumento de globulinas no soro como mecanismo de defesa, com conseqüente redução da A:G, foi relatado por Thomas (2000) em casos de estresse e inflamação e, por Sahoo e Mukherjee (2001) em peixes alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano. Nesta pesquisa, peixes alimentados com a dieta teste por sete dias apresentaram aumento da relação A:G imediatamente após a realização dos desafios, com diminuição significativa na concentração de globulinas nos peixes submetidos ao desafio com *A. hydrophila*, em relação aos peixes alimentados por maior período. Ao final dos desafios, o maior valor da relação A:G nos peixes alimentados por sete dias com a dieta teste em relação aos peixes dos demais tratamentos, foi associado tanto ao aumento da albumina plasmática como à diminuição das globulinas.

Novamente pode-se inferir que os peixes alimentados com a dieta teste por sete dias apresentaram menor resistência orgânica frente às situações adversas impostas. Observou-se, ainda, nos diferentes momentos de recuperação da homeostase pelos peixes após o estresse por transporte, que os peixes desse tratamento apresentaram valores da relação A:G maiores. Estudos mostraram aumento das globulinas em peixes alimentados com dietas suplementadas com  $\beta$ -glucano (Misra et al., 2006); entretanto, no presente estudo, a alimentação com  $\beta$ -glucano durante sete dias não foi suficiente para aumentar a resistência quando comparado com períodos maiores de alimentação.

Durante situações adversas, a liberação de catecolaminas nos peixes proporciona ainda aumento do fluxo sangüíneo e da permeabilidade das brânquias, facilitando dessa maneira a troca de gás carbônico por oxigênio, o qual é mais exigido durante situações de estresse (Carneiro, 2001). O aumento na permeabilidade das brânquias permite ainda a

perda de eletrólitos, como sódio e cloreto, além do influxo de água, causando distúrbios osmoregulatório e eletrolítico em peixes de água doce (McDonald e Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997).

Neste estudo, o estresse por transporte apesar da baixa densidade, também determinou alterações eletrolíticas. Os peixes de todos os tratamentos apresentaram dificuldade de manter as concentrações de sódio sérico e principalmente de cloreto plasmático, imediatamente após o transporte, retornando aos valores iniciais em 24 horas; sendo que, os peixes alimentados com a dieta teste por sete dias apresentaram os menores valores desses íons. Respostas semelhantes foram relatadas por Carneiro e Urbinati (2001) para matrinxãs, *Brycon cephalus*, submetidos ao transporte por 4 horas sem a adição de sal na água e por Redding e Schreck (1983) para salmão do pacífico, *Oncorhynchus kisutch*, submetidos ao estresse de confinamento em água isotônica.

O aumento do potássio sérico observado nos peixes deste estudo ao final do transporte, pode ser resultado da maior fragilidade dos eritrócitos, causada pelo aumento dos níveis de catecolaminas em situações de estresse, conforme relatado por Carneiro e Urbinati (2001) e observado no plasma e soro dos peixes ao final do transporte, os quais apresentavam coloração vermelha característica de hemólise. Este resultado não se repetiu a partir de 24 horas após o transporte.

No presente estudo, a elevação da concentração de amônia plasmática, imediatamente após o estresse por transporte, foi também relatada por El-Shafey (1998) e Carneiro e Urbinati (2002). Contudo, nesta pesquisa, este aumento não foi representativo, possivelmente em virtude da baixa densidade utilizada. Somado a este fato, o jejum realizado nos peixes durante o período pré-transporte também pode ter contribuído para a diminuição da excreção de amônia, conforme relatado por Grottum et al. (1997). Níveis de amônia não ionizada, na água de transporte, inferiores aos considerados tóxicos foram igualmente reportado por El-Shafey (1998).

Estudos demonstraram que a suplementação de  $\beta$ -glucano na dieta melhorou a resistência em peixes (Raa et al., 1990; Nikl et al., 1993; Siwicki et al., 1994; Efthimiou, 1996; Robertsen, 1999). Segundo Robertsen et al. (1994), o aumento da resistência contra bactérias patogênicas em peixes alimentados com  $\beta$ -glucanos é explicado, em parte, pelo aumento da atividade fagocítica dos macrófagos. O aumento na produção de intermediários

reativos do oxigênio pelos monócitos/macrófagos e neutrófilos é considerado um dos indicadores da ativação do sistema imune não específico em peixes (Jeney e Anderson, 1993; Jorgensen e Robertsen, 1995).

A redução na produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio pelas células de defesa em função da baixa temperatura, como relatado nesta pesquisa, nos peixes de todos os tratamentos submetidos ao estímulo pelo frio, foram anteriormente descritos por Hardie et al. (1994) e Cook et al. (2003). Os peixes alimentados por sete dias com a dieta teste apresentaram menor produção de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, de maneira não significativa, proporcionando menor resistência tanto nos peixes submetidos ao estímulo pelo frio como para os infectados por *A. hydrophila*. Estes resultados, somados aos anteriormente apresentados com relação à produção de células brancas de defesa, confirmam a menor resistência orgânica.

Respostas contrárias foram obtidas por Sahoo e Mukherjee (2001) em pesquisa com a carpa indiana, *Labeo rohita*, os quais determinaram proteção contra *A. hydrophila* quando alimentadas por sete dias com dietas suplementadas com 0,1% de  $\beta$ -glucano. Semelhantemente, Kumari e Sahoo (2006) relataram que a suplementação com 0,1% de  $\beta$ -glucano durante sete dias na dieta para bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, foi suficiente para aumentar a resistência não específica frente a situações adversas. No entanto, Couso et al. (2003) observaram maior resistência e produção do reativo intermediário do oxigênio quando douradas, *Sparus aurata*, foram alimentadas com dietas suplementadas por mais de 15 dias com 0,1% de  $\beta$ -glucano e desafiadas com *Photobacterium damsela*.

A inconsistência dos resultados obtidos nas pesquisas conduzidas com  $\beta$ -glucano em dietas para peixes ressalta a importância do protocolo de estudo com destaque para a forma de administração, nível de suplementação e período de administração deste imunoestimulante. Ressalta-se ainda que a estrutura e a fonte do glucano influenciam sua atividade. Por essas razões, o produto e sua atividade devem ser considerados, pois comparações tornam-se difíceis quando da utilização de produtos comerciais (Raa, 1996; Gannam e Schrock, 2001).

Pesquisas demonstraram que o período de 30 dias (0,1% de  $\beta$ -glucano na dieta) foi suficiente para melhor resistência para truta arco-íris submetidas a estresse (Jeney et al., 1997; Volpatti et al., 1998). No entanto, o tempo de 42 dias de alimentação (250,0 mg

$\beta$ -glucano /kg dieta) foi necessário para a carpa indiana apresentar maior atividade do macrófago, lisozima e sistema complemento quando desafiadas com *A. hydrophila* e *Edwardsiella tarda* (Misra et al., 2006).

Contudo, o período de 40 dias de administração contínua de 0,2% de  $\beta$ -glucano promoveu fadiga no sistema imune do camarão marinho, *Penaeus monodon*, como resultado do estado de alerta intermitente (Chang et al., 2000). A exaustão do sistema imune foi anteriormente descrita por Castro et al. (1999), os quais relataram que a resposta induzida pelo  $\beta$ -glucano é eficiente e rápida sobre a atividade respiratória de leucócitos. Diferentemente, a vitamina C administrada constantemente não se mostrou prejudicial para *Penaeus monodon* (Chang et al., 1996).

A suplementação de vitamina C em níveis elevados apresenta resultados contraditórios, com melhora na resistência contra *A. hydrophila* em carpa, *Cirrhinus mrigala*, e *Vibrio harveyi* para *Pseudosciaena crocea*, e, ausente de efeito positivo contra *A. hydrophila* para híbridos de tilápia, *Oreochromis aureus* x *O. niloticus* (Nitzan et al., 1996; Sobhana et al., 2002; Ai et al., 2006).

Avaliando-se os resultados de mortalidade cumulativa após o desafio com a bactéria, observou-se que foram representativos em relação aos resultados dos parâmetros anteriormente discutidos referente a esse desafio. Em síntese, a menor porcentagem de sobrevivência dos peixes alimentados por sete dias com a dieta teste, acompanhado da menor concentração de globulinas e da menor produção dos intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, contribuiu para menor resistência orgânica dos peixes frente a esse desafio.

A redução da porcentagem de mortalidade sob condições de imunossupressão ou estresse em função de suplementação com  $\beta$ -glucano foi descrita para carpa indiana (Sahoo e Mukherjee, 2002) e para salmonídeos infectados com *Vibrio anguillarum* e alimentados com 0,2% de  $\beta$ -glucano na dieta (Burrels et al., 2001).

Os resultados desse estudo permitem concluir que a alimentação com 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta durante 15 dias, ou mais, proporcionou aumento da resistência orgânica dos peixes frente ao estímulo pelo frio, estresse por transporte e desafio com *Aeromonas hydrophila* e, que, a administração dessa dieta durante

sete dias não foi suficiente para manter e/ou proporcionar adequada resposta após juvenis de tilápia do Nilo serem submetidos a situações adversas.

### Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de estudo concedida e a BIORIGIN pelo apoio científico.

### Referências

- AI, Q.; MAI, K.; TAN, B.; XU, W.; ZHANG, W.; MA, H.; LIUFU, Z. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, v.261, p.327-336, 2006.
- ALVES DE ANDRADE, J.I.; ONO, E.A.; BRASIL, E.M.; MENEZES, G.C.; MATSUURA, T.; SOUZA, R.T.Y.B.; OLIVEIRA, S.R.; TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E.G. Influência da vitamina C na dieta do matrinhã *Brycon amazonicus* após infecção por *Aeromonas hydrophila*. In: AQUACIÊNCIA, 2006, Bento Gonçalves. *Anais...CD-ROM*.
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.2, p.281-307, 1992.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R.; GUIMARÃES, I.G. Nutrição e saúde de peixes. In: COLÉGIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. *Anais... São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal*. 1 CD-ROM.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North Am. J. Aquacult.*, 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. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.1, p.3-26, 1991.
- BELEM-COSTA, A. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. 2003. 54p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BLY, J.E.; CLEM, L.W. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* v.28, p.159-171, 1992.
- BURRELS, C.; WILLIAMS, P.D.; FORNO, P.F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds, effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture*, v.199, p.159-169, 2001.
- CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquacult. Res.*, v.32, p.298-307, 2001.

- CARNEIRO, P.C.F. *Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã, Brycon cephalus (Teleostei: Characidae)*. 2001. 145f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquacult. Int.*, v.10, p.221–229, 2002.
- 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 Immunol.*, v.9, p.529-541, 1999.
- CHANG, C.F.; CHEN, H.Y.; SU, M.S.; LIAO, I.C. Immunomodulation by dietary beta-1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.10, p.505-514, 2000.
- CHANG, C.F.; SU, M.S.; CHEN, H.Y.; LIAO, I.C. Vibriosis resistance and wound healing enhancement of *Penaeus monodon* by beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune* and polyphosphorylated 1-ascorbic acid. *J. Taiwan Fish. Res.*, v.4, p.43-54, 1996.
- CHEN, D.; AINSWORTH, A.J. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, v.15, p.295-304, 1992.
- CHEN, G.R.; SUN, L.T.; LEE, Y.H.; CHANG, C.F. Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. *J. Appl. Aquacult.*, v.5, p.21-31, 1995.
- 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 Immunol.*, v.14, p.333-345, 2003.
- COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARINOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*, v.219, p.99-109, 2003.
- EFTHIMIOU, S. Dietary intake of  $\beta$ -1,3/1,6 glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae: effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. *J. Appl. Ichthyol.*, v.12, p.1-7, 1996.
- EL-SHAFFEY, A.A.M. Effect of ammonia on respiratory functions of blood of *Tilapia zilli*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.121A, p.305-313, 1998.
- ENGLESMA, M. Acute temperature stress effects on leucocyte populations and antibody response in carp, *Cyprinus carpio* L. In: —. *Neuroendocrine-immune interaction in carp: a role for cortisol and interleukin-1*. 2002. p.158. PhD (thesis) - Wageningen Agricultural University, Wageningen.
- FALCON, D.R. Lipídeo e vitamina C em dietas práticas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2004. 149f. Dissertação (Mestrado em Zootecia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Antibiotics residue in aquaculture products. Rome: The State of World Fisheries and Aquaculture, 2002. p.74-82.

- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PEZZATO, A.C.; FURUYA, V.R.B.; MIRANDA, E.C. Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acids in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, v.35, p.1110-1116, 2004.
- GALEOTTI, M. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *J. Appl. Ichthyol.*, v.14, p.189-199, 1998.
- GANNAM, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in fish diets. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. p.235-260.
- GENTZKOW, C.J.; MASEN, J.M. Na accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. Biol. Chem.*, v.143, p.531-544, 1942.
- GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.38, p.283-290, 2003.
- GREEN, L.C.; LUGURIAGA, V.R.; WAGUER, D.A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YEUNG, V.R.; TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.78, p.7764-7768, 1981.
- GROTTUM, J.A.; STAURNES, M.; SIGHOLT, T. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. *Aquacult. Res.*, v.28, p.159-164, 1997.
- HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, v.18, p.57-66, 1994.
- 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.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, p.7-12, 2000.
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; NILSSEN, K. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, v.168, p.387-394, 1998.
- JAIN, N.C. *Schalm's veterinary haematology*. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986. 1221p.
- JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v.116, p.315-329, 1993.
- JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. Prevention of stress in rainbown trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, v.154, p.1-15, 1997.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. *Applied multivariate statistical analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998. 816p.
- JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast  $\beta$ -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, v.19, p.43-57, 1995.



- KUMARI, J.; SAHOO, P.K. High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Molec. Cel. Biochem.*, v.280, p.25-33, 2005.
- KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary  $\beta$ -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *J. Fish Dis.*, v.29, p.95-101, 2006.
- KWAK, J.K., PARK, S.W., KOO, J.G., CHO, M.G., BUCHHOLZ, R., GOETZ, P. Enhancement of the non-specific defense activities in carp (*Cyprinus carpio*) and flounder (*Paralichthys olivaces*) by oral administration of Schizophyllan. *Acta Biotechnol.*, v.23, p.359-371, 2003.
- LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on tissue vitamin C concentration in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and clearance rate at two temperatures- A preliminary investigation. *J. Appl. Aquacult.*, v.4, p.59-71, 1994.
- LI, M.H.; WISE, D.J.; ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.*, v.29, p.1-8, 1998.
- LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., KLESIUS, P.H. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: ANAIS DO 1º SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, Botucatu. *Anais...* Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FMVZ, UNESP, 2005, p.46-83.
- LIM, C.; SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H. The effect of ascorbic acid on the immune response in fish. In: DABROWSKI, K. (Ed.). *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms*. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.149-166.
- MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK JR., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca*, v.30, p.71-80, 2004.
- McDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G.W.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press. 1997. p.119-144.
- 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.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrient requirements of fish*. Washington: Academy Press, 1993. 125p.
- NIKL, I.; 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*. *Dis. Aquat. Org.*, v.17, p.191-196, 1993.
- NIKL, L.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T.P.T. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, v.12, p.7-12, 1991.
- NITZAN, S.; ANGEONI, H.; GUR, N. Effects of ascorbic acid polyphosphate (AAPP) enrichment on growth, survival and disease resistance of hybrid tilapia. *Isr. J. Aquacult.*, v.48, p.133-141, 1996.

- NOLAN, D.T.; OP'T VELD, R.L.J.M.; BALM, P.H.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*\_Peters/, to net confinement. *Aquaculture*, v.177, p.297-309, 1999.
- ORTUNO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, v.12, p.1-12, 2002.
- PATTERSON, J.A., BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Sci.*, v.82, p.627-631, 2003.
- PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004. p.74-169.
- PICK, E.; MIZEL, D. Rajid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophage in culture using and automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol.*, v.46, p.211-26, 1981.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta*, to disease without reducing the white blood cell count. *J. Fish Biol.*, v.27, p.611-619, 1985.
- PILARSKI, F. Imunização de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com antígeno obtido de *Flavobacterium columnare* e suplementação alimentar com vitamina C. 2006. 118f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal.
- PLUMB, J.A.; BOWSER, P.R. *Microbial fish disease laboratory manual*. Alabama: Auburn University, Alabama Agriculture Experiment Station, 1983. 95p.
- RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v. 4, n.3, p.229-288, 1996.
- 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*. Manila: Asian Fisheries Society, 1990. p.39-50.
- REDDING, J.M.; SCHRECK, C.B. Influence of ambient salinity on osmoregulation and cortisol concentration in yearling coho salmon during stress. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.112, p.80-807. 1983.
- ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol.*, v.9, p.269-290, 1999.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.  $\beta$ -glucans as immunostimulants in fish. In: STOLEN, J.; FLETCHER, T.C. (Eds). *Modulators of fish immune responses*. Fair Haven: SOS Publications, 1994. p.83-99.
- 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 Immunol.*, v.11, p.683-95, 2001.
- SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish Shellfish Immunol.*, v.12, p.1-16, 2002.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, v.172, p.63-92, 1999.

- SECOMBES, C.J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: STOLEN, J.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; VAN MUISWINKEL, W.B. (Eds). *Techniques in fish immunology*. Fair Haven: SOS Publications, 1990. p.137-154.
- 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 Immunol.*, v.19, p.293-306, 2005.
- SHAMA, S., BRANDAO, D.A., VARGAS, A.C. Bactéria com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. *Ciênc. Rural*, v.30, p.293-298, 2000.
- SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.41, p.125-139, 1994.
- SOBHANA, K.S.; MOHAN, C.V.; SHANKAR, K.M. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, v.207, p.225-238, 2002.
- THOMAS, J.S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.891-989.
- TORT, L.; ROTLLANT, J.; ROVIRA, L. Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* v.120A, p.175-179, 1998.
- URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004. p.171-193.
- VAN DER BOON, J.; VAN DEN THILLART, G.E.E.J.M.; ADDINK, A.D.F. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.100A, p.47-53, 1991.
- VAN-WEERD, J.H., KOMEN, J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.120, p.107-112, 1998.
- VOLPATTI, D.; D'ANGELO, L.; JENEY, G.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P.; GALEOTTI, M. Non specific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *J. Appl. Ichthyol.*, v.14, p.201-206, 1998.
- WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, v.77, p.591-625, 1997.
- YANO, T.; MATSUYAMA, H.; MANGINDAAN, R.E.P. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.*, v.14, p.577-582, 1991.
- ZAR, J.H. 1999. Biostatistical analysis. 4<sup>a</sup>ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc., 663p.

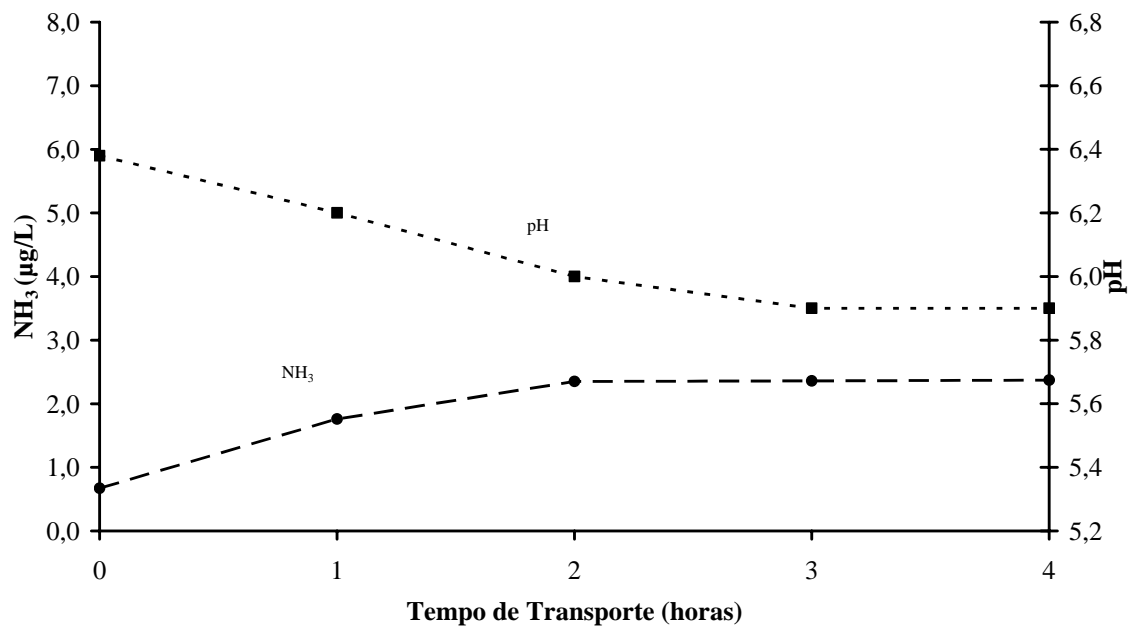


Figura 1. Amônia não ionizada ( $\mu\text{g/L}$ ) e pH da água de transporte de juvenis de tilápia do Nilo.

Tabela 1. Percentual dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais

Ingrediente	0% $\beta$ -glucano 125,0 mg vit C (Dieta Controle)	0,1% $\beta$ -glucano 600,0 mg vit C (Dieta Teste)
Farelo soja	28,520	28,520
Gluten de milho	14,088	14,088
Farinha peixe	3,000	3,000
Farinha carne - 40	3,500	3,500
Fubá milho	2,000	2,000
Farelo trigo	12,500	12,500
Quirera de arroz	27,150	27,150
Amido de milho	1,072	0,823
Celulose	2,380	2,380
L-lisina	0,970	0,970
DL-metionina	0,380	0,380
Triptofano	0,020	0,020
Treonina	0,380	0,380
Fosfato bicálcico	3,380	3,380
Sal comum	0,100	0,100
Suplem vit e min <sup>1</sup>	0,500	0,500
BHT <sup>2</sup>	0,020	0,020
$\beta$ -glucano <sup>3</sup>	---	0,118
Vitamina C <sup>4</sup>	0,040	0,171
TOTAL (%)	100	100
Energia digestível (kcal)	3000,00	3000,00
Proteína digestível (%)	28,00	28,00
Fibra bruta	5,00	5,00
Extrato etéreo	2,63	2,63
Cálcio total	2,00	2,00
Fósforo disponível	0,80	0,80
DL-metionina	0,75	0,75
AAS	0,91	0,91
L- lisina	2,10	2,10
Triptofano	0,26	0,26
Treonina	1,23	1,23
Vitamina C (mg/kg)*	92,00	492,00

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico e mineral (Supre Mais, níveis/kg do produto): Vitamina A, 1.200.000 UI; Vitamina D<sub>3</sub>, 200.000 UI; Vitamina E 1.200 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 2.400 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 4.800 mcg; Vitamina B<sub>6</sub>, 4.800 mg; **Vitamina C, zero**<sup>5</sup>; Pantotenato de cálcio, 12.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Ácido fólico, 1.200 mg; Biotina, 48 mg; Cloreto de colina, 108 g; Cobalto, 10 mg; Cobre, 3.000 mg; Sulfato ferroso heptahidratado, 50.000 mg; Iodo, 100 mg; Manganês, 20.000 mg; Selênio, 100 mg; Sulfato de zinco, 30.000 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g; <sup>2</sup>Antioxidante; <sup>3</sup> $\beta$ -glucano 85,0%; <sup>4</sup>Vitamina C 35,0% ativa; <sup>5</sup>Adequado à pesquisa; \* Analisado.

Tabela 2. Valores médios e desvio-padrão do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), porcentagem de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), concentração de proteína plasmática total (PPT), relação albumina-globulina (A:G), cortisol plasmático (Cort), glicose (Glic), número de leucócitos totais (Leuc total), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr), porcentagem de monócitos (Mon), intermediários reativos do oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e do nitrogênio (NO) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vitamina C e submetidos ao estímulo pelo frio<sup>1</sup>

Dieta Teste (dias)	Erit (10 <sup>6</sup> / $\mu$ L)	Htc (%)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	PPT (%)	A:G	Cort (mg/dL)	Glic (mg/dL)	Leuc total ( $\mu$ L)	Linf (%)	Neutr (%)	Mon (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nmol	NO Mmol
45	1,78 ( $\pm$ 0,10)	18,40 ( $\pm$ 3,65)	4,94 ( $\pm$ 1,28)	103,37 ( $\pm$ 24,90)	26,85 ( $\pm$ 3,24)	2,04 ( $\pm$ 0,17)	1,00 ( $\pm$ 0,28)	5,13b ( $\pm$ 1,08)	60,00 ( $\pm$ 6,46)	65300,00a ( $\pm$ 8413,93)	80,00 ( $\pm$ 2,28)	11,80 ( $\pm$ 2,00)	8,20 ( $\pm$ 1,48)	0,08 ( $\pm$ 0,06)	3,75 ( $\pm$ 1,56)
30	1,77 ( $\pm$ 0,08)	16,80 ( $\pm$ 4,11)	4,93 ( $\pm$ 1,50)	95,52 ( $\pm$ 20,30)	28,94 ( $\pm$ 4,89)	2,08 ( $\pm$ 0,08)	0,97 ( $\pm$ 0,19)	5,08b ( $\pm$ 0,85)	66,60 ( $\pm$ 7,92)	61600,00a ( $\pm$ 12789,24)	79,00 ( $\pm$ 5,48)	13,20 ( $\pm$ 3,90)	7,80 ( $\pm$ 2,49)	0,09 ( $\pm$ 0,03)	3,52 ( $\pm$ 1,24)
15	1,84 ( $\pm$ 0,12)	17,80 ( $\pm$ 3,35)	5,17 ( $\pm$ 1,72)	96,06 ( $\pm$ 24,94)	28,26 ( $\pm$ 5,80)	2,04 ( $\pm$ 0,13)	0,99 ( $\pm$ 0,18)	5,07b ( $\pm$ 1,10)	61,60 ( $\pm$ 5,59)	64300,00a ( $\pm$ 9176,03)	79,40 ( $\pm$ 4,56)	11,80 ( $\pm$ 1,92)	8,80 ( $\pm$ 3,35)	0,10 ( $\pm$ 0,06)	2,25 ( $\pm$ 0,62)
07	1,64 ( $\pm$ 0,11)	22,60 ( $\pm$ 2,34)	4,87 ( $\pm$ 0,80)	137,89 ( $\pm$ 26,76)	21,72 ( $\pm$ 6,41)	2,18 ( $\pm$ 0,19)	1,29 ( $\pm$ 0,23)	8,61a ( $\pm$ 1,12)	64,00 ( $\pm$ 10,10)	34500,00b ( $\pm$ 10265,34)	81,80 ( $\pm$ 6,04)	11,00 ( $\pm$ 3,77)	7,20 ( $\pm$ 2,59)	0,06 ( $\pm$ 0,03)	2,10 ( $\pm$ 0,52)

<sup>1</sup> Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente, nível P.

Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), concentração de proteína plasmática total (PPT), relação albumina-globulina (A:G), número de leucócitos totais (Leuc total), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr), porcentagem de monócitos (Mon), intermediários reativos do oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e do nitrogênio (NO) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com β-glucano e vitamina C e submetidos a desafio com *Aeromonas hydrophila*<sup>1</sup>

Dieta Teste (dias)	Erit (10 <sup>6</sup> /μL)	Htc (%)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	PPT (%)	A:G	Leuc total (μL)	Linf (%)	Neutr (%)	Monoc (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nmol	NO μmol
45	1,86 (± 0,12)	27,10 (± 5,13)	6,96 (± 1,11)	145,70 (± 25,74)	25,68 (± 2,01)	3,15 (± 0,16)	0,59 (± 0,14)	80100,00 (± 23343,63)	80,60 (± 3,91)	13,40 (± 3,59)	6,00 (± 1,73)	0,28 (± 0,04)	5,15 (± 1,10)
30	1,89 (± 0,14)	27,00 (± 5,34)	6,93 (± 0,95)	142,86 (± 26,00)	25,67 (± 2,29)	3,12 (± 0,22)	0,65 (± 0,14)	77700,00 (± 27589,86)	79,60 (± 4,50)	13,60 (± 2,19)	6,80 (± 4,27)	0,27 (± 0,05)	5,18 (± 0,96)
15	1,89 (± 0,22)	27,00 (± 2,35)	7,40 (± 0,94)	143,64 (± 9,08)	27,46 (± 2,63)	3,12 (± 0,15)	0,63 (± 0,12)	78300,00 (± 38713,04)	79,00 (± 4,15)	14,00 (± 3,20)	7,00 (± 5,96)	0,29 (± 0,06)	5,72 (± 1,39)
07	1,81 (± 0,11)	28,50 (± 4,24)	6,67 (± 0,88)	157,46 (± 22,40)	23,40 (± 2,53)	2,98 (± 0,14)	0,84 (± 0,11)	68200,00 (± 29463,11)	87,00 (± 4,32)	8,80 (± 2,66)	4,00 (± 1,58)	0,24 (± 0,04)	5,04 (± 0,47)

<sup>1</sup> Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente, nível P.

Tabela 4. Mortalidade cumulativa e porcentagem de sobrevivência (SBV) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vitamina C e submetidos a desafio com *Aeromonas hydrophila*

Dieta Teste (dias)	Mortalidade Cumulativa – dias após o desafio													SBV (%)	
	1°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	Total		
45	0	0	1	3	4	6	6	7	9	9	9	9	9	9	62,50
30	0	0	1	2	3	5	6	6	8	8	8	8	8	8	66,67
15	0	0	1	2	4	6	7	9	9	9	9	9	9	9	62,50
7	0	0	2	4	7	8	10	11	12	13	13	13	13	13	45,83



Tabela 5. Valores médios e desvio-padrão inicial (I), final (F), 24 e 72 horas após o transporte do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vitamina C e submetidos a estresse por transporte<sup>1</sup>

Dieta Teste (dias)	Erit ( $10^6/\mu\text{L}$ )		Htc (%)		Hb (g/dL)					
	I	F	I	F	I	F				
45	2,02 ( $\pm 0,18$ )	2,25a ( $\pm 0,10$ )	2,07 ( $\pm 0,17$ )	26,40 ( $\pm 2,30$ )	28,20 ( $\pm 3,83$ )	28,00 ( $\pm 3,67$ )	6,18 ( $\pm 0,90$ )	7,42a ( $\pm 0,52$ )	7,45 ( $\pm 1,13$ )	6,41 ( $\pm 0,95$ )
	1,99	2,20a	2,11	27,00	29,20	27,60	6,13	7,22a	7,01	6,37
30	2,01 ( $\pm 0,15$ )	2,18a ( $\pm 0,15$ )	2,03 ( $\pm 0,16$ )	26,80 ( $\pm 1,87$ )	29,00 ( $\pm 2,00$ )	27,80 ( $\pm 3,36$ )	6,21 ( $\pm 1,12$ )	7,47a ( $\pm 0,52$ )	6,76 ( $\pm 1,47$ )	6,51 ( $\pm 0,62$ )
	2,02B ( $\pm 0,14$ )	2,58bA ( $\pm 0,12$ )	1,97B ( $\pm 0,11$ )	26,00 ( $\pm 3,27$ )	31,20 ( $\pm 2,83$ )	27,20 ( $\pm 3,49$ )	6,05B ( $\pm 0,91$ )	8,49Ab ( $\pm 0,45$ )	7,42AB ( $\pm 0,89$ )	6,25B ( $\pm 0,82$ )
07	2,02B ( $\pm 0,19$ )	2,30AB ( $\pm 0,23$ )	1,97B ( $\pm 0,17$ )	26,00 ( $\pm 2,92$ )	31,20 ( $\pm 2,38$ )	27,20 ( $\pm 3,27$ )	6,05B ( $\pm 1,14$ )	8,49Ab ( $\pm 0,37$ )	7,42AB ( $\pm 1,43$ )	6,25B ( $\pm 0,82$ )
<b>VCM</b> (fL)										
45	130,69 ( $\pm 23,19$ )	129,77 ( $\pm 17,37$ )	133,65 ( $\pm 17,06$ )	135,27 ( $\pm 24,53$ )	23,42 ( $\pm 1,97$ )	25,41 ( $\pm 1,31$ )	26,42 ( $\pm 2,84$ )	22,89 ( $\pm 2,24$ )		
	135,68 ( $\pm 22,05$ )	132,72 ( $\pm 21,87$ )	130,19 ( $\pm 19,28$ )	130,81 ( $\pm 16,01$ )	22,70 ( $\pm 1,09$ )	24,73 ( $\pm 1,19$ )	25,40 ( $\pm 2,64$ )	23,08 ( $\pm 2,54$ )		
30	133,33 ( $\pm 19,63$ )	133,03 ( $\pm 20,44$ )	128,43 ( $\pm 23,02$ )	136,95 ( $\pm 23,71$ )	23,17 ( $\pm 1,55$ )	25,76 ( $\pm 1,59$ )	25,80 ( $\pm 1,74$ )	23,42 ( $\pm 2,36$ )		
	128,71 ( $\pm 20,50$ )	120,93 ( $\pm 31,71$ )	122,61 ( $\pm 23,25$ )	138,07 ( $\pm 21,70$ )	23,27B ( $\pm 1,04$ )	27,21A ( $\pm 1,29$ )	26,31AB ( $\pm 2,63$ )	23,00B ( $\pm 2,34$ )		
<b>CHCM</b> (%)										
45	130,69 ( $\pm 23,19$ )	129,77 ( $\pm 17,37$ )	133,65 ( $\pm 17,06$ )	135,27 ( $\pm 24,53$ )	23,42 ( $\pm 1,97$ )	25,41 ( $\pm 1,31$ )	26,42 ( $\pm 2,84$ )	22,89 ( $\pm 2,24$ )		
	135,68 ( $\pm 22,05$ )	132,72 ( $\pm 21,87$ )	130,19 ( $\pm 19,28$ )	130,81 ( $\pm 16,01$ )	22,70 ( $\pm 1,09$ )	24,73 ( $\pm 1,19$ )	25,40 ( $\pm 2,64$ )	23,08 ( $\pm 2,54$ )		
30	133,33 ( $\pm 19,63$ )	133,03 ( $\pm 20,44$ )	128,43 ( $\pm 23,02$ )	136,95 ( $\pm 23,71$ )	23,17 ( $\pm 1,55$ )	25,76 ( $\pm 1,59$ )	25,80 ( $\pm 1,74$ )	23,42 ( $\pm 2,36$ )		
	128,71 ( $\pm 20,50$ )	120,93 ( $\pm 31,71$ )	122,61 ( $\pm 23,25$ )	138,07 ( $\pm 21,70$ )	23,27B ( $\pm 1,04$ )	27,21A ( $\pm 1,29$ )	26,31AB ( $\pm 2,63$ )	23,00B ( $\pm 2,34$ )		

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes períodos de alimentação com a dieta teste dentro de um mesmo momento; Letras maiúsculas comparam o mesmo período de alimentação com a dieta teste em momentos diferentes; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente, nível P.

Tabela 6. Valores médios e desvio-padrão inicial (I), final (F), 24 e 72 horas após o transporte da concentração de proteína plasmática total (PPT), relação albumina-globulina (A:G), número de leucócitos totais (Leuc total), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr) e porcentagem de monócitos (Mon) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vitamina C e submetidos a estresse por transporte<sup>1</sup>

Dieta	PPT				A:G				Leuc totais					
	Teste		(% )		F		I		F		I		F	
(dias)	F	I	24h	72h	F	I	24h	72h	F	I	24h	72h	F	I
45	3,32 ( $\pm 0,33$ )	2,71 ( $\pm 0,48$ )	2,98 ( $\pm 0,14$ )	2,71 ( $\pm 0,48$ )	1,49 ( $\pm 0,27$ )	1,65 ( $\pm 0,31$ )	1,22 ( $\pm 0,28$ )	1,58 ( $\pm 0,49$ )	54900,00B ( $\pm 4722,29$ )	88700,00A ( $\pm 17455,66$ )	71300,00AB ( $\pm 14153,62$ )	102800,00A ( $\pm 19018,41$ )	54900,00B ( $\pm 4722,29$ )	88700,00A ( $\pm 17455,66$ )
30	3,44 ( $\pm 0,36$ )	2,84 ( $\pm 0,46$ )	2,94 ( $\pm 0,19$ )	2,84 ( $\pm 0,46$ )	1,41 ( $\pm 0,62$ )	1,43 ( $\pm 0,26$ )	1,32 ( $\pm 0,31$ )	1,56 ( $\pm 0,23$ )	57700,00B ( $\pm 13953,49$ )	98100,00A ( $\pm 22628,52$ )	77600,00AB ( $\pm 13957,08$ )	101000,00A ( $\pm 27829,84$ )	57700,00B ( $\pm 13953,49$ )	98100,00A ( $\pm 22628,52$ )
15	3,32 ( $\pm 0,36$ )	2,76 ( $\pm 0,13$ )	2,94 ( $\pm 0,13$ )	2,76 ( $\pm 0,13$ )	1,47 ( $\pm 0,39$ )	1,62 ( $\pm 0,63$ )	1,28 ( $\pm 0,37$ )	1,76 ( $\pm 0,44$ )	56600,00B ( $\pm 19831,79$ )	102200,00A ( $\pm 29802,68$ )	70200,00AB ( $\pm 14232,88$ )	102700,00A ( $\pm 25864,07$ )	56600,00B ( $\pm 19831,79$ )	102200,00A ( $\pm 29802,68$ )
07	3,24 ( $\pm 0,37$ )	2,71 ( $\pm 0,64$ )	2,94 ( $\pm 0,19$ )	2,71 ( $\pm 0,64$ )	1,55 ( $\pm 0,52$ )	1,64 ( $\pm 0,26$ )	1,53 ( $\pm 0,38$ )	1,77 ( $\pm 0,59$ )	46300,00B ( $\pm 10545,14$ )	121700,00A ( $\pm 43714,41$ )	64400,00AB ( $\pm 15836,28$ )	85100,00A ( $\pm 15243,52$ )	46300,00B ( $\pm 10545,14$ )	121700,00A ( $\pm 43714,41$ )

Dieta	Linf				Neutr				Mon					
	Teste		(% )		F		I		F		I		F	
(dias)	F	I	24h	72h	F	I	24h	72h	F	I	24h	72h	F	I
45	68,00B ( $\pm 2,74$ )	80,47A ( $\pm 2,99$ )	82,93A ( $\pm 5,39$ )	80,47A ( $\pm 2,99$ )	28,25A ( $\pm 5,65$ )	10,75B ( $\pm 4,38$ )	13,33B ( $\pm 5,20$ )	12,87B ( $\pm 3,36$ )	3,75 ( $\pm 1,09$ )	3,00 ( $\pm 1,27$ )	3,47 ( $\pm 0,51$ )	6,67 ( $\pm 2,30$ )	3,75 ( $\pm 1,09$ )	3,00 ( $\pm 1,27$ )
30	69,25B ( $\pm 5,85$ )	82,75A ( $\pm 4,09$ )	82,75A ( $\pm 4,09$ )	83,53A ( $\pm 1,12$ )	26,00A ( $\pm 2,92$ )	12,00B ( $\pm 7,18$ )	14,25B ( $\pm 2,51$ )	10,93B ( $\pm 3,72$ )	4,75 ( $\pm 3,42$ )	4,50 ( $\pm 1,50$ )	3,00 ( $\pm 0,71$ )	5,53 ( $\pm 2,12$ )	4,75 ( $\pm 3,42$ )	4,50 ( $\pm 1,50$ )
15	66,27B ( $\pm 6,75$ )	80,60A ( $\pm 4,80$ )	82,25A ( $\pm 5,40$ )	80,60A ( $\pm 4,80$ )	29,53A ( $\pm 5,80$ )	12,75B ( $\pm 8,93$ )	13,50B ( $\pm 4,03$ )	12,80B ( $\pm 1,61$ )	4,20 ( $\pm 2,49$ )	2,50 ( $\pm 2,06$ )	4,25 ( $\pm 2,00$ )	6,53 ( $\pm 3,87$ )	4,20 ( $\pm 2,49$ )	2,50 ( $\pm 2,06$ )
07	72,50B ( $\pm 4,55$ )	81,80A ( $\pm 5,02$ )	77,00AB ( $\pm 10,91$ )	81,80A ( $\pm 5,02$ )	23,00A ( $\pm 4,25$ )	9,40B ( $\pm 2,52$ )	19,20A ( $\pm 2,53$ )	12,20B ( $\pm 3,42$ )	4,50 ( $\pm 1,92$ )	4,40 ( $\pm 2,51$ )	3,80 ( $\pm 1,30$ )	6,00 ( $\pm 2,87$ )	4,50 ( $\pm 1,92$ )	4,40 ( $\pm 2,51$ )

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes períodos de alimentação com a dieta teste dentro de um mesmo momento; Letras maiúsculas comparam o mesmo período de alimentação com a dieta teste em momentos diferentes; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente, nível P.

Tabela 7. Valores médios e desvio-padrão inicial (I), final (F), 24 e 72 horas após o transporte da concentração de cortisol (Cort) e glicose (Glic) plasmáticos de juvenis de tilápia do Nilo arraçados por diferentes dias com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vitamina C e submetidos a estresse por transporte<sup>1</sup>

Dieta Teste (dias)	Cort		Cort		Cort		Glic		Glic	
	(I) (mg/dL)	(F) (mg/dL)	(24h) (mg/dL)	(72h) (mg/dL)	(I) (mg/dL)	(F) (mg/dL)	(24h) (mg/dL)	(72h) (mg/dL)		
45	7,30C ( $\pm 2,74$ )	37,31bA ( $\pm 3,64$ )	17,96bB ( $\pm 4,12$ )	6,50bC ( $\pm 1,37$ )	47,00B ( $\pm 9,25$ )	103,25A ( $\pm 6,69$ )	54,00B ( $\pm 9,67$ )	52,50B ( $\pm 5,50$ )		
	8,26C ( $\pm 2,75$ )	36,94bA ( $\pm 5,38$ )	15,78bB ( $\pm 4,96$ )	6,13bC ( $\pm 1,86$ )	46,00B ( $\pm 12,35$ )	93,50A ( $\pm 12,23$ )	48,00B ( $\pm 5,24$ )	57,00B ( $\pm 10,27$ )		
15	5,50C ( $\pm 2,98$ )	34,50bA ( $\pm 3,40$ )	17,79bB ( $\pm 4,12$ )	5,40bC ( $\pm 1,92$ )	44,25B ( $\pm 11,78$ )	98,25A ( $\pm 9,88$ )	53,00B ( $\pm 3,08$ )	48,50B ( $\pm 4,03$ )		
	5,97D ( $\pm 2,00$ )	49,10aA ( $\pm 1,86$ )	28,49aB ( $\pm 3,11$ )	10,70aC ( $\pm 1,28$ )	48,75B ( $\pm 9,78$ )	111,75A ( $\pm 9,38$ )	59,25B ( $\pm 7,66$ )	52,75B ( $\pm 5,90$ )		

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes períodos de alimentação com a dieta teste dentro de um mesmo momento; Letras maiúsculas comparam o mesmo período de alimentação com a dieta teste em momentos diferentes; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente, nível P.

Tabela 8. Valores médios e desvio-padrão inicial (I), final (F), 24 e 72 horas após o transporte da concentração de sódio sérico (Na), cloreto plasmático (Cl) potássio sérico (K) e amônia plasmática (NH<sub>3</sub>) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados por diferentes dias com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano e vitamina C e submetidos a estresse por transporte<sup>1</sup>

Dieta Teste (dias)	Na (mEq/L)				Cl (mEq/L)			
	I	F	24h	72h	I	F	24h	72h
45	79,61 ( $\pm 11,30$ )	72,83 ( $\pm 19,63$ )	96,96 ( $\pm 11,70$ )	77,43 ( $\pm 10,00$ )	140,25A ( $\pm 4,41$ )	126,36B ( $\pm 1,60$ )	139,00A ( $\pm 5,98$ )	141,77A ( $\pm 3,78$ )
30	89,22 ( $\pm 8,70$ )	73,13 ( $\pm 14,35$ )	91,30 ( $\pm 13,48$ )	81,22 ( $\pm 7,83$ )	143,08A ( $\pm 4,70$ )	123,59B ( $\pm 5,03$ )	138,60A ( $\pm 4,70$ )	141,21A ( $\pm 3,79$ )
15	83,91 ( $\pm 6,52$ )	73,13 ( $\pm 13,48$ )	90,87 ( $\pm 14,78$ )	80,61 ( $\pm 3,91$ )	146,14A ( $\pm 8,17$ )	124,55B ( $\pm 3,99$ )	137,34A ( $\pm 5,91$ )	143,33A ( $\pm 8,70$ )
07	83,91 ( $\pm 10,72$ )	66,71 ( $\pm 13,52$ )	97,39 ( $\pm 16,09$ )	85,22 ( $\pm 5,65$ )	149,73A ( $\pm 7,19$ )	120,53B ( $\pm 4,65$ )	131,38B ( $\pm 4,29$ )	146,69A ( $\pm 5,78$ )

Dieta Teste (dias)	K (mEq/L)				NH <sub>3</sub> (mEq/L)			
	I	F	24h	72h	I	F	24h	72h
45	4,36B ( $\pm 1,08$ )	8,21A ( $\pm 2,08$ )	4,36B ( $\pm 0,58$ )	3,56B ( $\pm 0,87$ )	115,00 ( $\pm 14,97$ )	133,50 ( $\pm 6,98$ )	114,50 ( $\pm 50,67$ )	106,25 ( $\pm 37,03$ )
30	3,59B ( $\pm 1,03$ )	8,72A ( $\pm 3,36$ )	3,99B ( $\pm 0,69$ )	3,82B ( $\pm 0,51$ )	107,25 ( $\pm 7,36$ )	135,25 ( $\pm 33,48$ )	113,00 ( $\pm 14,14$ )	104,25 ( $\pm 10,80$ )
15	5,13B ( $\pm 0,77$ )	11,77A ( $\pm 3,31$ )	4,62B ( $\pm 0,85$ )	3,35B ( $\pm 1,33$ )	107,50 ( $\pm 10,04$ )	121,50 ( $\pm 20,85$ )	120,00 ( $\pm 55,35$ )	107,50 ( $\pm 25,51$ )
07	4,36B ( $\pm 0,51$ )	13,59A ( $\pm 4,31$ )	5,59B ( $\pm 0,97$ )	4,85B ( $\pm 1,03$ )	119,25 ( $\pm 9,90$ )	134,25 ( $\pm 20,02$ )	126,25 ( $\pm 12,03$ )	106,25 ( $\pm 17,28$ )

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes períodos de alimentação com a dieta teste dentro de um mesmo momento; Letras maiúsculas comparam o mesmo período de alimentação com a dieta teste em momentos diferentes; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente, nível P.

## **CAPÍTULO IV**

### **IMPLICAÇÕES**

## IMPLICAÇÕES

Este estudo sugeriu as seguintes implicações:

1. A intensificação dos sistemas de produção expõe de maneira relevante a inter-relação entre os peixes e o ambiente onde vivem, demonstrando ao produtor a importância da manutenção do equilíbrio orgânico dos peixes, para o enfrentamento das situações adversas. A disponibilidade de dieta balanceada com princípios pautados em nutrição, saúde e responsabilidade ambiental representam entre outros fatores, inerentes a produção intensiva de peixes, diminuição das perdas e aumento da resistência dos peixes frente a agentes estressores.
2. O estabelecimento de protocolo para avaliação de imunoestimulantes visando padronizar o período de administração, a forma e a concentração do produto se faz necessário para que se possa evitar possíveis respostas contraditórias nos diferentes estudos.
3. A resposta positiva do uso de imunoestimulantes em dietas nas semanas que antecedem manejos intensos, não necessariamente significa que o produtor terá que adquirir mais um tipo de dieta no universo da produção. A utilização desses compostos na forma de “núcleo” permitiria que o próprio produtor incorporasse esse “núcleo” na dieta no momento adequado. Para tal, pesquisas necessitam serem conduzidas com esse intuito.