

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA DE PACU (*Piaractus
mesopotamicus*) COM VITAMINA C: RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS, IMUNIDADE NÃO ESPECÍFICA E
RESISTÊNCIA À INOCULAÇÃO COM *Aeromonas
hydrophila***

Rafael estevan Sabioni

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA DE PACU (*Piaractus
mesopotamicus*) COM VITAMINA C: RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS, IMUNIDADE NÃO ESPECÍFICA E
RESISTÊNCIA À INOCULAÇÃO COM *Aeromonas
hydrophila***

Rafael estevan Sabioni

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia (Produção Animal)

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Agosto de 2009

S116s Sabioni, Rafael Estevan
Suplementação dietária de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com
vitamina C: Respostas fisiológicas, imunidade não específica e
resistência a inoculação com *Aeromonas hydrophila* / Rafael estevan
Sabioni. -- Jaboticabal, 2009
vii, 51f.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati
Banca examinadora: Fabiana Pilarski, Júlio Herman Leonhardt
Bibliografia

1. Sistema imune. 2. peixes. 3. imunoestimulantes. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.31:591.1

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL ESTEVAN SABIONI – Nascido em Londrina, Paraná, no dia 12 de agosto de 1981, Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Londrina em 2001. Realizou seu estágio de conclusão de curso no ano de 2005, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Campus de Jaboticabal, no laboratório de Morfologia e Fisiologia Animal, para onde retornou no ano de 2007, iniciando o curso de mestrado em zootecnia, concluído em agosto de 2009 com a submissão da dissertação de mestrado à banca examinadora.

Dedico

Aos meus pais, Sergio e Vera.

Distância ou tempo algum apagarão do meu coração o amor,
dedicação, ensinamentos e apoio de vocês recebidos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela orientação, oportunidade, dedicação, compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Júlio Herman Leonhardt. Pela oportunidade, amizade e importante colaboração na conclusão deste trabalho.

À Dra. Fabiana Pilarsky, pela grande colaboração, tanto na realização quanto na conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Leonardo Susumu Takahashi, pela importante ajuda em várias etapas da realização deste trabalho e amizade.

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim, da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Física e Química, pela colaboração nas análises imunológicas, pela disposição de materiais e equipamentos laboratoriais.

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, pelo auxílio na realização de análises imunológicas, pela disposição e ensinamentos oferecidos.

À Damares Perecim Roviero, pela colaboração e amizade oferecidas ao longo destes anos.

Aos meus irmãos, Luiz Alberto e Maria Lívia, pelo carinho e apoio oferecidos.

A toda minha família em Londrina e Ibitinga, pelo carinho e apoio.

Aos amigos, Donizete, Jean, Thiago, Cristina, Andréa, Michele, Renan, Daniel, Hugo, Renata, Camila, Junior, Andicléa, Cris, Loredana, Lívia, Maria Fernanda, Maria Carolina, Márcio, Rafael (Alemão), Rafael Goulart, André, Mauro, Rodolfo, Vítor e “tia” Isabel. O apoio e amizade de vocês recebidos foram muito importantes, mesmo que à distância.

Aos amigos da república “Pasárgada”, Thiago (Nogento), Marcel (Dudu), Rodrigo (Tenista) e Carlos, por terem dividido mais que as contas e o aluguel.

Aos amigos, Argos, João, Igor, Ângelo, Luiz (Pudendo), Márcia (Saidinha), Aline (Kokotinha), Walter (Biskoitão), Ana Luiza (Parlê), Pedro (Parlito), Suzana (Shoya), Limatão, Olívia (Taxinha), Marina, Fabrizia (Moeda), Adélia (Celú) e Lílian, pela amizade e apoio oferecidos.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Animal, Ana Paula Baldan, Fabiano, Márcio, Monyka, Luciana, Janessa, Sergio, Michele, Leonardo, Jaqueline, Carla (Minhoca), Mônica (H’), Gustavo (Sumô), Fábio (Spinha), Marcos, Lidiane, Rodrigo, Aline, Mariana, Rullian e Ana Paula, pelas inúmeras colaborações, ensinamentos e companheirismo.

À todos os funcionários do Centro de Aquicultura da UNESP e do departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

À Ana Maria, pela companhia, compreensão, carinho e energia positiva.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Sistema imune dos peixes.....	2
2.2. Estresse e imunidade.....	4
2.3. <i>Aeromonas hydrophila</i>	5
2.4. Nutrição e imunidade.....	6
2.5. Modelo biológico.....	9
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Instalações e animais.....	10
4.2. Delineamento experimental.....	11
4.3. Rações experimentais.....	11
4.4. Amostragens.....	14
4.5. Análises.....	15
5. RESULTADOS Experimento 1.....	20
5.1. Atividade respiratória de leucócitos e proteína total sérica.....	20
5.2. Indicadores hematológicos.....	22
5.3. Indicadores zootécnicos.....	23
6. RESULTADOS - Experimento 2.....	25
6.1. Mortalidade cumulativa.....	26
6.2. Atividade respiratória de leucócitos.....	26
6.3. Concentração de lisozima sérica.....	27
6.4. Atividade hemolítica do sistema complemento – Via alternativa.....	27
6.5. Proteína total sérica.....	28
6.6. Indicadores hematológicos.....	29
7. DISCUSSÃO.....	34
8. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura cresce no Brasil e no mundo em ritmo acelerado. Como qualquer atividade econômica, tem por objetivo o maior índice produtivo possível, porém, na busca por uma melhor produção, situações estressantes como adensamento, má qualidade da água, transporte e manuseio podem provocar diminuição na imunidade, susceptibilidade a doenças e mortalidade, efeitos contrários aos desejados.

Muitos microorganismos patogênicos são regularmente encontrados no ambiente aquático e no trato digestivo dos peixes, e apresentam ampla distribuição e capacidade de adaptação, a exemplo da *Aeromonas hydrophila*, bactéria oportunista, agente etiológico da septicemia hemorrágica em peixes e responsável por grandes prejuízos na piscicultura.

Algumas técnicas utilizadas com o objetivo de minimizar as conseqüências do estresse têm se mostrado promissoras, como por exemplo, a administração de estimulantes da imunidade por meio da alimentação. O sistema imune dos peixes é semelhante ao dos demais vertebrados e apresenta componentes de defesa específica e não específica. Algumas proteínas e células constituintes do sistema imune podem ser identificadas e quantificadas em peixes, servindo como biomarcadores, que podem fornecer informações sobre a saúde e a condição imunológica dos animais. A lisozima, enzima lítica presente no muco, sangue e outros fluidos corporais, e o sistema complemento, conjunto de proteínas presentes no soro, capazes de destruir microorganismos invasivos, atuam nas respostas não específicas do sistema imune e têm se mostrado ferramentas importantes na determinação do seu funcionamento e na avaliação de estratégias para sua estimulação.

Nutrição e saúde estão intimamente relacionadas. Sabe-se que as vitaminas e outros nutrientes desempenham papéis importantes em várias atividades fisiológicas. Em muitas pesquisas, a suplementação da dieta com vitaminas C e E proporcionou redução de processos oxidativos, melhora do desempenho produtivo e eficiência da resposta imune em peixes.

O estudo das respostas imunológicas é relativamente recente no campo da aqüicultura, portanto existe a necessidade de aprimoramento de técnicas experimentais, colheita, tratamento e análise de materiais biológicos assim como identificação de substâncias com potencial imunestimulante e adequação de níveis seguros e tempos de administração eficazes para sua utilização.

Entre as substâncias com ação imunestimulante atualmente utilizadas em aqüicultura, estão químicos sintéticos, derivados de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, fatores nutricionais, hormônios e citoquinas. As vitaminas têm participação importante em várias funções biológicas. As vitaminas C e E, por terem ação positiva e sinérgica no sistema imunológico, proteção contra doenças e produtos tóxicos e desempenho produtivo, são muito estudadas como imunostimulantes.

Entre as espécies de peixes importantes na produção brasileira, está o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), de grande interesse para piscicultura comercial e pesca esportiva, devido ao hábito alimentar onívoro, rusticidade, crescimento rápido e domínio da tecnologia de reprodução artificial. Por estes motivos, é uma espécie com características zootécnicas sujeitas a inúmeras pesquisas que buscam um pacote tecnológico para sua criação. Embora seja muito estudado, pouco se conhece a respeito do sistema imunológico da espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SISTEMA IMUNE DOS PEIXES

O sistema imune dos peixes é semelhante ao dos demais vertebrados, apresentando respostas imunes inatas ou não específicas, que funcionam como uma primeira barreira contra microorganismos, e respostas imunes específicas, responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e produção de anticorpos específicos (Bernstein et al., 1998).

A imunidade inata é constituída por vários componentes que incluem, células, proteínas, glicoproteínas e peptídeos, presentes em tecidos e fluidos corporais e que possuem ação antimicrobiana. Algumas proteínas foram identificadas em peixes, a exemplo da mucotripsina, transferrina, lisozima, proteínas do sistema complemento e lectinas. Fazem parte dos componentes celulares da imunidade não específica, as células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e as denominadas “natural killers”, que interagem com linfócitos e outras células do sistema imune por meio das citocinas (Dalmo et al., 1997). Muitas moléculas que atuam na resposta imune inata podem ser utilizadas como marcadores no monitoramento da saúde dos peixes e na avaliação do efeito de imunostimulantes (Robertsen, 1999).

O sistema complemento, composto por cerca de 35 proteínas solúveis, desempenha um papel importante na imunidade não específica atuando nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (Secombes, 1996; Claire et al., 2002; Boshra e Sunyer, 2006). A ativação do sistema complemento ocorre pelas vias clássica e alternativa. A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e imunoglobulinas agregadas, enquanto a via alternativa é ativada pela presença de certos fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos. Em peixes, a atividade bactericida é decorrente principalmente da ativação da via alternativa (Koppenheffer, 1987).

Dentre as ações das proteínas do sistema complemento, a mais conhecida é a capacidade de destruir patógenos criando perfurações em suas membranas, ação que caracteriza a via alternativa do sistema. As proteínas do sistema complemento também estão envolvidas nos mecanismos de recrutamento de células fagocíticas em reações inflamatórias e na exposição de antígenos aos linfócitos, atividades relacionadas com a via clássica do sistema (Claire et al., 2002; Boshra e Sunyer, 2006).

A lisozima é uma molécula importante na defesa do organismo contra patógenos. É uma enzima que tem origem em leucócitos e apresenta atividade lítica sobre membranas de diversas espécies de bactérias, tanto em bactérias Gram positivas quanto negativas. Em peixes, encontra-se amplamente distribuída sobre a pele, muco, brânquias, trato intestinal, soro, tecidos linfóides e outros fluidos corporais. Variações

nos níveis de lisozima podem ocorrer devido a sazonalidade, sexo, maturação sexual, alimentação, temperatura da água, estresse e infecções (Hernández e Tort, 2003). A mensuração da lisozima pode ter valor diagnóstico na determinação da condição imunológica e resistência a doenças (Saurabh e Sahoo, 2008).

Embora ambas as respostas, inatas e específicas, tenham papéis fundamentais na defesa contra patógenos, acredita-se que, para os peixes, as respostas inatas sejam mais expressivas (Urbinati e Carneiro, 2004).

O entendimento da biologia dos peixes, em particular da resposta imune é importante para um manejo sanitário apropriado. O sistema inato dos peixes tem gerado interesse crescente nos últimos anos e considerado um fator chave na defesa primária e na organização da imunidade adquirida (Whyte, 2007).

2.2. ESTRESSE E IMUNIDADE

O estresse consiste em um conjunto de respostas do organismo animal que tem início com estímulos desagradáveis e ameaçadores e segue com uma resposta do sistema nervoso central que, por meio do sistema hormonal, promove uma série de alterações fisiológicas que preparam o organismo para se defender e sobreviver à adversidade. As respostas podem variar conforme a intensidade e duração do estímulo (Barton e Iwama, 1991). Alguns estímulos estressores como adensamento, perseguição, exposição aérea, manuseio e transporte estão presentes em maiores ou menores intensidades e são inevitáveis na rotina de uma piscicultura (Urbinati e Carneiro, 2004).

A imunossupressão é uma das respostas típicas de uma condição de estresse, além das respostas primárias (aumento da secreção de cortisol) e secundárias metabólicas (hiperglicemia), iônicas (alteração na concentração de sódio, potássio e cloreto) e hematológicas (alteração de parâmetros da série vermelha) (Bonga, 1997). Quando os peixes acionam o sistema de defesa para compensar os efeitos negativos

de estímulos adversos, um papel regulador importante tem sido atribuído ao sistema neuro-endócrino, que envolve o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal.

Durante o estresse, as concentrações de cortisol e catecolaminas aumentadas atuam nos tecidos hematopoiéticos (rim cefálico, baço) diminuindo a produção de linfócitos, enquanto que macrófagos e linfócitos podem ser diretamente afetados pelos hormônios (Ellis, 1981).

A diminuição da quantidade e atividade dos componentes que compõem o sistema imune pode diminuir a resistência dos peixes e facilitar a atividade de microorganismos patogênicos oportunistas, como *Aeromonas hydrophila*. Os imunostimulantes podem ser utilizados estrategicamente antes de manejos estressantes, dando aos animais melhores condições de defesa como mostram estudos recentes (Robertsen, 1999; Sakai, 1999; Raa, 2000).

2.3. *Aeromonas hydrophila*

A bactéria *Aeromonas hydrophila*, agente etiológico da enfermidade conhecida como septicemia hemorrágica, é um bastonete ou coco-bastonete Gram negativo aeróbio ou anaeróbio facultativo, presente em praticamente todos os ambientes aquáticos (cosmopolitas), assim como na pele e no trato intestinal dos peixes de água doce (Holliman, 1993). A ampla distribuição da bactéria e sua adaptação a mudanças ambientais devem-se a ampla variedade de enzimas secretadas por suas cepas (Pemberton et al., 1997).

A manifestação da septicemia hemorrágica está normalmente relacionada a situações estressantes como a ocorrência de parasitoses (Martins, 2000), condições inapropriadas da água tais como grande quantidade de matéria orgânica, baixa concentração de oxigênio dissolvido, oscilações térmicas e outras formas de fragilidade dos hospedeiros (Post, 1987). Em peixes, a septicemia hemorrágica é caracterizada pela presença de pequenas lesões de superfície, com perda de escamas, hemorragias

locais, principalmente em brânquias e opérculos, úlceras, abscessos, exoftalmia e distensão abdominal (Austin e Austin, 2007).

A *Aeromonas hydrophila* é um dos mais importantes patógenos descritos na aquicultura brasileira (Godoy et al., 2008). Pode representar um grave problema econômico em uma piscicultura, com prejuízos para a saúde dos peixes, trabalhadores e consumidores (Vieira, 2003), motivos pelos quais é importante a pesquisa e investigação da eficácia de imunostimulantes na prevenção desta doença em lugar do uso de quimioterápicos que podem ocasionar contaminação do meio aquático e prevalência de bactérias, dificultando o tratamento (Sakai, 1999).

2.4. NUTRIÇÃO E IMUNIDADE

O sistema imunológico é influenciado direta ou indiretamente pelos nutrientes ingeridos na alimentação, portanto, a adequação dos níveis dos mesmos na formulação de uma dieta é de extrema importância (Pezzato et al., 2004) e um caminho economicamente promissor para o aumento da produtividade em sistemas intensivos de criação de peixes (Menezes et al., 2006). A estimulação da imunidade, e conseqüente aumento da resistência a doenças tem sido alvo de muitos estudos (Robertsen, 1999; Sakai, 1999). Dentre os grupos das substâncias mais estudadas como imunostimulantes encontram-se químicos sintéticos (levamisole), derivados de bactérias (β -glucano e LPS-lipopolisacarídeo), polissacarídeos (quitosana), extratos de plantas e animais, fatores nutricionais (vitamina C e vitamina E), hormônios (prolactina e hormônio do crescimento), citoquinas (interleucina e lactoferrina), entre outros (Sakai, 1999). Embora não se possa esperar, de um imunostimulante, um efeito específico e duradouro como os observados no uso de vacinas e quimioterápicos, tem-se como vantagem condições de uso mais seguras que antibióticos, podendo ser utilizados em casos de resistência aos mesmos. Em comparação com a vacinação, os imunostimulantes são eficazes e podem ser utilizados para ampliar e prolongar o efeito protetor das vacinas (Sakai, 1999).

As vitaminas constituem um grupo de substâncias orgânicas com composição química e funções biológicas variadas. São representadas por micro-nutrientes importantes em várias atividades fisiológicas, incluindo proteção contra doenças, efeitos positivos ao sistema imune, e efeitos protetores contra exposição a produtos tóxicos. As vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol) desempenham papel importante como anti-oxidantes, tendo demonstrado que a administração combinada das duas vitaminas foi capaz de reduzir processos oxidativos provocados por substâncias tóxicas (Güney et al., 2007; Uzunhisarciki et al., 2007). A suplementação de vitamina C e E também teve efeito na redução do estresse oxidativo provocado por cobre, em peixes (Vijayavel, 2006).

Acredita-se que os peixes teleósteos não sejam capazes de sintetizar a vitamina C, por falta da enzima L-gulogalactona oxidase (GLO), que tem participação na sua biossíntese (Moreau, 2000). Em pesquisa com 13 espécies de peixes amazônicos, observou-se que somente duas espécies, não teleósteos, apresentaram atividade da enzima GLO, o que reforça a hipótese (Fracalossi et al., 2001).

A vitamina E é lipofílica, está presente constantemente nas membranas celulares e atua na estabilidade das mesmas, enquanto a vitamina C, hidrofílica, combate radicais livres nos fluidos extracelulares, além de recuperar o tocoferol do radical tocoferoxil das membranas, um sinal da interatividade nos efeitos dessas vitaminas (Güney et al., 2007).

Em experimento *in vitro* com *Sparus aurata*, a associação das vitaminas C e E promoveu aumento na atividade de macrófagos, o que não ocorreu quando as vitaminas foram testadas sozinhas (Mulero et al., 1998). As atividades séricas da lisozima e da via alternativa do sistema complemento aumentaram, em *Lateolabrax japonicus*, com o aumento do ácido ascórbico dietário. Quando o nível chegou a 489 mg k⁻¹, estes parâmetros foram significativamente maiores que de todos os outros tratamentos (Ai et al., 2004). Um incremento na concentração de lisozima sérica foi observado em peixes com capacidade de sintetizar vitamina C. Dietas suplementadas com vitamina C proporcionaram melhores respostas imunológicas e resistência a doenças em esturjões (*Acipenser baerii*) (Xie et al., 2006). Em outro estudo, a

suplementação da dieta de *Labeo rohita* com vitamina C, em doses mais altas que a recomendada, por oito semanas, proporcionou melhora na atividade respiratória de leucócitos, concentração de lisozima, atividade das proteínas do sistema complemento, resistência a doenças, crescimento e eficiência alimentar (Misra et al., 2007).

Estudo recente avaliou o efeito da interação das vitaminas C (0, 100 e 2000 mg kg⁻¹) e E (0,50 e 500 mg kg⁻¹) no crescimento, conteúdo hepático do ácido ascórbico e β-tocoferol, hematologia e resposta imune do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Yildirim-Aksoy et al., 2008). Os resultados do estudo mostraram que a suplementação da dieta com 100 mg kg⁻¹ de vitamina C e 23 mg kg⁻¹ de vitamina E promoveu um bom desempenho do crescimento. Na ausência da vitamina C a vitamina E protegeu os peixes contra os sinais clássicos da deficiência de vitamina C em peixes (lordose, escoliose, enfraquecimento na formação de colágeno, cartilagens alteradas, lesões em olhos, pele hemorrágica, lesões em rim, fígado, intestino e músculos) (Halver, 2002), mas não afetou o crescimento. A suplementação das duas vitaminas permitiu índices hematológicos adequados e a quantidade dietária das vitaminas foi proporcional às quantidades presente no fígado. A suplementação com 100 mg kg⁻¹ de vitamina C foi suficiente para aumentar a proteína sérica e a produção de ânions superóxidos, que também foi aumentada pela suplementação de vitamina E na concentração de 500 mg kg⁻¹. Os outros parâmetros imunológicos não foram afetados pelas vitaminas. Da mesma forma, Garcia et al. (2007) estudaram a resposta hematológica de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e E e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. A suplementação com as duas vitaminas não reduziu a taxa de mortalidade dos peixes frente ao desafio com a bactéria, porém, para peixes criados em sistema intensivo, em que a principal fonte de nutrientes é oriunda da ração, a suplementação com essas vitaminas assume grande importância e os níveis de vitaminas C e E recomendados para pacu, nestas situações, são 500 e 250 mg kg⁻¹ de ração, respectivamente.

Em outro estudo, pacus que receberam suplementação de vitamina E (0, 100 e 450 mg kg⁻¹) apresentaram melhores respostas inflamatórias, devido ao aumento na

eficiência de recrutamento de macrófagos, fusão dos mesmos com formação de células gigantes e nas respostas a antígenos (Belo et al., 2005).

2.5. MODELO BIOLÓGICO

O pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), da família Characidae e subfamília Myleninae, é encontrado nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975). Sua maior distribuição ocorre na região Centro-Oeste, no Pantanal do Mato Grosso (Petrere, 1989). É um dos peixes nativos de maior importância econômica no Brasil (Queiroz et al., 2005; Urbinati e Gonçalves, 2005) e de grande interesse para piscicultura comercial e pesca esportiva, devido ao hábito alimentar onívoro, rusticidade, crescimento rápido e domínio da tecnologia de reprodução artificial (Oliveira et al., 2004).

A espécie tem sido muito estudada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, com enfoque na reprodução (Romagosa et al., 1990; Cruz-Landim et al., 2003; Iseki et al., 2003), larvicultura (Fregadolli, 2003; Jomori et al., 2003), alimentação e nutrição (Martins, 1998; Fernandes et al., 2001; Souza et al., 2000; Dias-Koberstein et al., 2005; Takahashi et al., 2006; Abimorad et al., 2004), parasitologia e sanidade (Martins et al., 2000; 2002; Garcia et al., 2007), manejo e respostas de estresse (Krieger et al., 1989; Martins et al., 2000; Takahashi et al., 2006; Biller et al., 2008; Abreu et al., 2009; Mataqueiro et al., 2009). Apesar destes estudos, pouco se conhece a respeito da ação de vitaminas em sua nutrição (Urbinati e Gonçalves, 2005), sendo poucos os trabalhos que exploram respostas imunológicas inatas da espécie (Belo et al., 2005; Abreu et al., 2006 a, b; Abreu et al., 2009; Biller et al., submetido).

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar respostas fisiológicas e imunológicas inatas de pacu alimentados com dietas suplementadas com quatro níveis de vitamina C (100, 200, 400 e 800 mg kg⁻¹) e um nível fixo de vitamina E (250 mg kg⁻¹) após seis e 12 semanas de alimentação, além de avaliar a resistência dos peixes ao desafio *Aeromonas hydrophila*, após 12 semanas de alimentação com as dietas experimentais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Instalações e animais

O presente estudo foi realizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP, Jaboticabal. Foram utilizados exemplares juvenis de pacu fornecidos pela Piscicultura Águas Claras (Mococa, SP), que permaneceram em um tanque escavado no Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal (CAUNESP) até atingirem peso médio de 30 g, quando foram classificados por faixas de peso para distribuição nos tratamentos experimentais. Os tratamentos foram distribuídos em 24 caixas de polietileno com capacidade de 100 litros, com sistema de renovação de água e aeração constantes e 12 horas de iluminação. Foram colocados, em cada caixa, 13 peixes com peso médio variando de 30 a 40g. Durante 15 dias, os animais permaneceram em adaptação às instalações e manejo, sendo alimentados duas vezes ao dia com ração comercial até a saciedade aparente. O protocolo seguiu com a introdução das dietas experimentais.

4.2. Delineamento experimental

O estudo foi dividido em dois experimentos. O delineamento aplicado aos mesmos foi inteiramente casualizado com oito tratamentos em esquema fatorial 4x2. No primeiro experimento, foram utilizados quatro níveis de vitamina C na ração (100, 200, 400, 800 mg kg⁻¹) e dois tempos de alimentação (seis e 12 semanas) e, no segundo, os mesmos níveis de vitamina C (mg kg⁻¹) e desafio com *Aeromonas hydrophila* (antes e depois do desafio). Ambos os experimentos foram conduzidos com seis repetições (caixas) por tratamento.

4.3. Rações experimentais

Quatro níveis de vitamina C foram acrescentados a uma dieta isoprotéica e isoenergética, que foi suplementada com um nível de vitamina E (250 mg kg⁻¹) e suplemento mineral e vitamínico isento das vitaminas supracitadas (Tabela 3). As concentrações das vitaminas (Tabela 1) foram escolhidas com base em Chagas e Val (2003), Menezes et al. (2006) e Garcia et al. (2007). A vitamina E foi adicionada a todas dietas em função da evidência de sua sinergia com vitamina C (Güney et al., 2007) e com a intenção de otimizar e evidenciar os efeitos da mesma. As fontes de vitaminas C e E utilizadas foram, respectivamente, ROVIMIX® STAY-C® 35 e ROVIMIX® E-50 Adsorbate (DSM). As fontes apresentam 35 e 50% de disponibilidade, respectivamente, portanto, para atingir os níveis desejados de vitaminas nas dietas foi feito um cálculo de ajuste (Tabela 2). Os ingredientes foram pesados e misturados, de acordo com a formulação (Tabela 3) e peletizados na Fábrica de Rações do CAUNESP. A vitamina foi misturada ao farelo de milho que, posteriormente, foi incorporado aos outros ingredientes, utilizando-se um misturador manual.

Tabela 1 – Concentrações de vitaminas das dietas experimentais.

Dieta	Vitamina C	Vitamina E
100	100 mg kg ⁻¹	250 mg kg ⁻¹
200	200 mg kg ⁻¹	250 mg kg ⁻¹
400	400 mg kg ⁻¹	250 mg kg ⁻¹
800	800 mg kg ⁻¹	250 mg kg ⁻¹

Tabela 2 – Cálculo de ajuste para níveis de vitaminas

Fonte	Atividade em 1g (%)	100% de Atividade (g)
ROVIMIX® STAY-C® 35	35	2,86
ROVIMIX® E-50 Adsorbate	50	2,00
Dieta	Correção vitamina C (g.kg⁻¹)	Correção vitamina E (g.kg⁻¹)
100	100 x 2,86 = 286	250 x 2 = 500
200	200 x 2,86 = 572	250 x 2 = 500
400	400 x 2,86 = 1.144	250 x 2 = 500
800	800 x 2,86 = 2.288	250 x 2 = 500

Tabela 3 – Formulação das dietas experimentais (%)

Ingredientes	Dietas (%)			
	100	200	400	800
Farinha de peixe	10,40	10,40	10,40	10,40
Farelo de soja	32,00	32,00	32,00	32,00
Farelo de Milho	25,12	25,09	25,04	24,92
Farelo de trigo	29,00	29,00	29,00	29,00
Óleo de soja	2,60	2,60	2,60	2,60
Fosfato bicálcico	0,50	0,50	0,50	0,50
Mistura mineral e vitamínica*	0,30	0,30	0,30	0,30
Vitamina C	0,03	0,06	0,11	0,23
Vitamina E	0,05	0,05	0,05	0,05
Composição centesimal estimada				
Matéria seca %	88,62	88,59	88,54	88,44
Proteína bruta %	27,56	27,56	27,55	27,54
Proteína digestível %	23,12	23,12	23,12	23,11
Extrato etéreo %	5,73	5,73	5,72	5,72
Fibra bruta %	4,68	4,67	4,67	4,67
Matéria mineral %	6,71	6,71	6,71	6,71
Extrato não nitrogenado %	43,94	43,92	43,88	43,79
Energia bruta kcal kg ⁻¹	4.098	4.097	4.095	4.090
Energia digestível kcal kg ^{-1**}	3.185	3.184	3.182	3.179

* Composição do suplemento mineral e vitamínico (kg): Ácido fólico 33,333 mg; ácido pantotênico 266,667 mg; biotina 33,333 mg; cobalto 1,667 mg; colina 6,666,667 mg; cobre 66,667 mg; ferro 500.000 mg; iodo 3,333 mg; manganês 166,667 mg; niacina 566,667 mg; selênio 2,333 mg; vitamina A 53.333.333 UI; vitamina B1 106,667 mg; vitamina B12 106,667 µg; vitamina B2 106,667 mg; vitamina B6 106,667 mg; vitamina D 15,000,000 UI; vitamina K 100,000 mg; zinco 500.000 mg.

** Abimorad e Carneiro (2004)

Cada ração foi oferecida aos peixes de seis caixas (repetições), duas vezes ao dia, até a saciedade aparente, durante 12 semanas. A cada uma das 24 caixas foi reservado um recipiente plástico contendo as rações experimentais, que era pesado antes de alimentar os peixes e após o último trato. O consumo diário por caixa foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final dos recipientes. Após 12 semanas,

os peixes foram submetidos à exposição aérea por um minuto e, em seguida, ao desafio com *Aeromonas hydrophila* por meio de injeção intraperitoneal de 1 mL de suspensão contendo 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) mL^{-1} da bactéria. A concentração representa a dose letal para 50% dos peixes (DL_{50}), padronizada pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP para juvenis de pacu. Durante uma semana pós-desafio foi registrada a mortalidade cumulativa e observados os sinais clínicos da doença.

4.4. Amostragens

Foram realizadas quatro amostragens: após o período de adaptação de 15 dias (parâmetros iniciais), seis e 12 semanas de alimentação e em uma semana após a inoculação da bactéria realizada ao final das 12 semanas de alimentação. Em cada uma, foram amostrados dois peixes de cada caixa. Os animais foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) para colheita de sangue por punção dos vasos caudais. Os peixes amostrados foram excluídos do experimento após aferição de peso e comprimento corporal para evitar o efeito da manipulação. Cada amostra de sangue foi dividida em três microtubos: um contendo 15 μL de EDTA + fluoreto de potássio (Glistab), o segundo, 15 μL de heparina sódica e o último sem anticoagulante. As alíquotas foram utilizadas para contagem de células vermelhas e separação de plasma, ensaio fagocítico de redução de NBT (*nitro blue tetrazolium*) e separação de soro, respectivamente. De cada amostra de sangue também foram preparadas extensões sanguíneas para contagem total e diferencial de leucócitos. Nas amostragens de seis e 12 semanas, todos os peixes foram pesados e medidos para o cálculo de desempenho zootécnico.

As propriedades limnológicas da água das caixas foram monitoradas semanalmente pela determinação das concentrações de oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 55), temperatura, potencial hidrogeniônico (pHmetro Corning) e amônia total (método do reagente de Nessler). As variáveis limnológicas mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o bem estar de peixes tropicais (Proença e Bittencourt,

1994), com valores médios de oxigênio dissolvido $5,62 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$, temperatura $29 \pm 0,7$ °C, pH $8,08 \pm 0,1$ e amônia total $0,76 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$.

4.5. Análises

4.5.1. Ensaio da atividade respiratória de leucócitos

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de Anderson e Siwicki (1995). Um volume de 0,1 mL de sangue heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de solução de *nitro blue tetrazolium* (NBT, Sigma) em tampão fosfato (pH 7,4) na concentração 0,2%. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 25 °C por 30 minutos. Da suspensão resultante foram retirados 50 µL e adicionados a 1 ml de N,N-dimetil formamida (DMF) em tubos de vidro de 5 mL, que foram centrifugados a 3000g por cinco minutos. A densidade óptica do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540nm.

4.5.2. Concentração de lisozima sérica

A concentração de lisozima sérica é determinada com base no método clássico de Smolelis e Hartsell (1949), onde uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* é usada como substrato para a lise, que é medida pela redução da densidade óptica por meio de espectrofotometria. A análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreu et al. (2009). A curva padrão foi estabelecida com seis concentrações de lisozima (50, 80, 100, 150, 200 e 300 ng em 300 µL de tampão fosfato de sódio – NaH_2PO_4 ; 0,05 M; pH 7,4). Um volume de 300 µL de cada concentração foi pipetado em uma cubeta de 1 mL seguido da adição de 300 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10 mg de bactéria em 50mL de tampão fosfato de sódio). A densidade óptica foi medida

imediatamente por espectrofotometria cinética, durante 10 minutos, com leituras realizadas a cada 20 segundos em comprimento de onda de 450 nm. A diferença entre a densidade óptica inicial e final (ΔDO) de cada concentração foi calculada para 5 minutos de leitura e a curva representada graficamente (Figura 1).

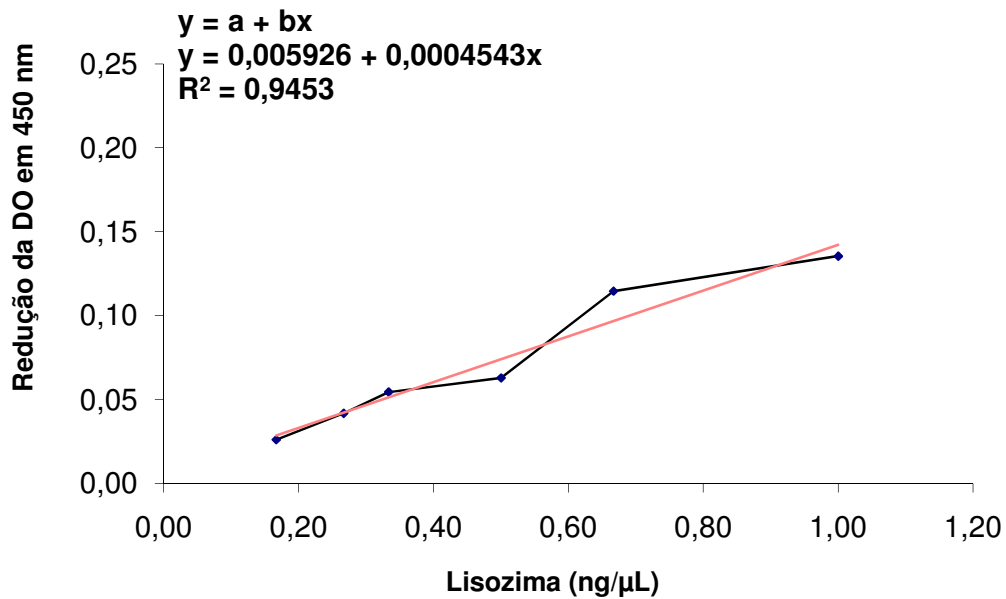


Figura 1. Curva padrão de lisozima. Os pontos representam os valores de ΔDO para cada concentração de lisozima testada.

As amostras de soro mantidas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram submetidas a tratamento térmico de $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, para inativação das proteínas do sistema complemento e garantia de que a lise foi provocada pela lisozima. O mesmo procedimento que determinou a curva padrão foi realizado com as amostras, utilizando-se volumes de $150\text{ }\mu\text{L}$ de soro e $150\text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato de sódio.

A concentração da lisozima de cada amostra foi quantificada, pela curva padrão determinada, utilizando a equação da reta e as respectivas ΔDO s.

4.5.3. Atividade hemolítica do complemento sérico – Via alternativa

A determinação da atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento foi realizada com base em Polhill et al. (1978), adaptado por Biller (2008). Foi realizado um ensaio cinético para determinar o tempo necessário para cada amostra lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. Para o preparo da suspensão, o sangue foi colhido por punção venosa com mesmo volume de solução Alséver (anticoagulante pH 6,1) e colocado em tubo de 50 mL com o mesmo volume de trietanolamina (TEA), ácido etileno diamino tetracético (EDTA) a 10 nM pH 7,4 e gelatina a 0,1%. A suspensão foi incubada por 15 minutos, a 37°C, e centrifugada a 480g por 10 minutos, a 4 °C. O mesmo procedimento de centrifugação foi repetido três vezes. Nas duas primeiras, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão TEA – Mg^{2+} 2 nM, pH 7,4. Na última, depois de descartado o sobrenadante, a solução de Alséver foi utilizada para ressuspensão das células que foram armazenadas a 4 °C. Nestas condições, o material pode ser utilizado por até 15 dias.

No momento da utilização, a suspensão foi centrifugada duas vezes, sendo ressuspensa em tampão TEA-EGTA (ácido etilenoglicol-bis-amino tetracético) 8 mM e Mg^{2+} 2 mM, com gelatina 0,1%. A proporção de tampão foi ajustada gradativamente para manter a densidade óptica da suspensão diluída 40 vezes entre 0,7 e 0,8 em comprimento de onda de 700 nm.

As amostras de soro, mantidas a – 70 °C, foram descongeladas em banho maria a 37 °C. A diluição de soro em tampão TEA-EGTA 8 mM e Mg^{2+} 2 mM, com gelatina 0,1%, foi de 1:10, previamente padronizada para soro de peixe. Desta forma, 60 µL de amostra e 140 µL de tampão foram pipetados em uma cubeta de 1 mL. Na seqüência, foram pipetados 400 µL da suspensão de hemácias e foi realizada a leitura cinética em espectrofotômetro, durante 10 minutos, com leituras a cada 20 segundos em comprimento de onda de 700 nm.

A atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento foi determinada pela velocidade em que cada amostra foi capaz de lisar 50% da suspensão de hemácias igualmente estabelecida para todas. Para se certificar que a

lise foi provocada pelas proteínas do sistema complemento, uma amostra de soro foi submetida a inativação em tratamento térmico de 56 °C, por 30 minutos, e submetida à leitura para determinação da inatividade hemolítica (Figura 2)

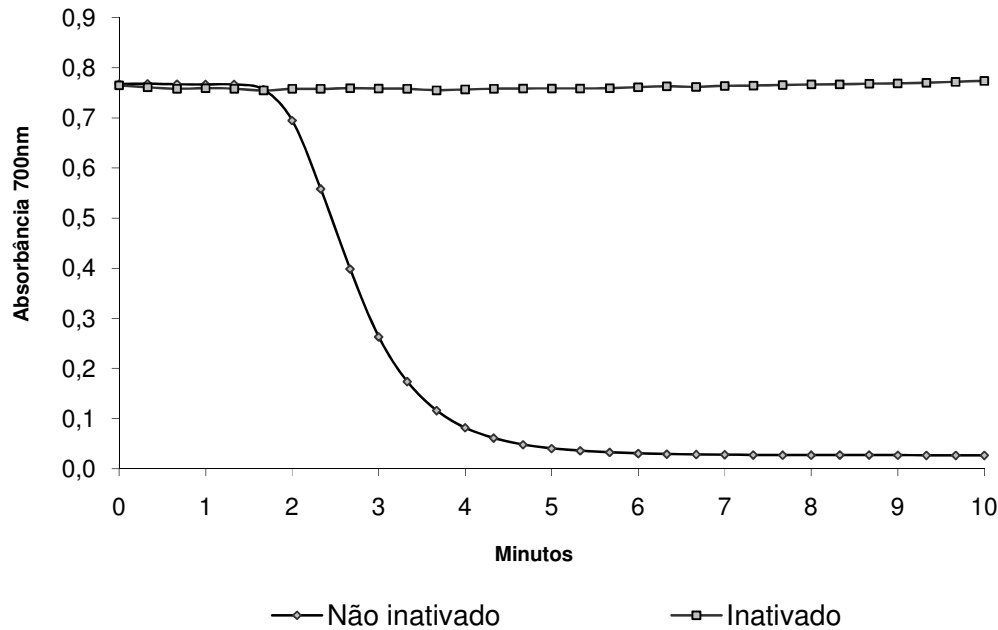


Figura 2. Atividade do sistema complemento. Leitura cinética da densidade óptica das amostras de soro: inativada por tratamento térmico e não inativada.

4.5.4. Proteína total sérica

A concentração de proteína total no soro foi determinada pelo método do biureto, com o kit Labtest Proteínas Totais.

4.5.5. Indicadores Hematológicos

O hematócrito, a concentração de hemoglobina, o número de eritrócitos e o volume corpuscular médio foram determinados no sangue total em contador automático de células sanguíneas (Celm CC550) de uso veterinário. A contagem total de células brancas foi realizada por meio de digitalização dos campos das lâminas de extensão e

contagem manual em software analisador de imagens (ImageJ 1.41o). Para a digitalização, utilizou-se um microscópio com câmera digital acoplada (Olympus). Os leucócitos foram quantificados indiretamente em extensões sanguíneas contando-se o número de trombócitos, leucócitos e eritrócitos para cada 2000 células.

4.5.6. Ganho de peso conversão alimentar e fator de condição

O ganho de peso foi calculado para cada tratamento pela diferença entre a média de peso final e inicial. A conversão alimentar foi calculada pela divisão do ganho de peso médio (g) pelo consumo médio de alimento (g). O fator de condição (K), índice que expressa parcialmente o estado nutricional, foi calculado pela fórmula: $K = (\text{peso}/\text{comprimento}^3) \times 100$. Os cálculos foram realizados utilizando os dados obtidos durante as biometrias realizadas.

4.5.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%) no programa estatístico SAS 9.2.

5. RESULTADOS - Experimento 1

No primeiro experimento foram testados quatro níveis de vitamina C (mg kg^{-1}) na ração (100, 200, 400, 800) e dois tempos de alimentação (seis e 12 semanas). Foram determinadas a atividade respiratória de leucócitos e a concentração de proteína total como indicadores imunológicos, hematócrito (HCT), contagem de eritrócitos, volume corpuscular médio (VCM), e hemoglobina (HGB), como indicadores hematológicos, e o ganho de peso, a conversão alimentar e o fator de condição como indicadores zootécnicos.

Por razões técnicas (descongelamento do freezer), as amostras de material biológico destinadas à determinação de atividade e concentração de lisozima e da via alternativa do sistema complemento se estragaram e não puderam ser utilizadas.

5.1. Atividade respiratória de leucócitos e proteína total sérica.

As médias de atividade respiratória de leucócitos, em seis e 12 semanas de alimentação, embora numericamente menores que a média inicial, só diferiram significativamente no tratamento 800 em 12 semanas (Figura 3). As médias de proteína total sérica foram significativamente menores que a média inicial em seis e 12 semanas em todos os tratamentos, com exceção dos tratamentos 200 em seis semanas e 400 em 12 semanas, porém não houve diferença entre concentrações de vitaminas (Figura 4).

Não houve interação entre os tratamentos (concentrações de vitamina) e o tempo de administração (seis e 12 semanas) tanto para a atividade respiratória de leucócitos quanto para proteína total sérica.

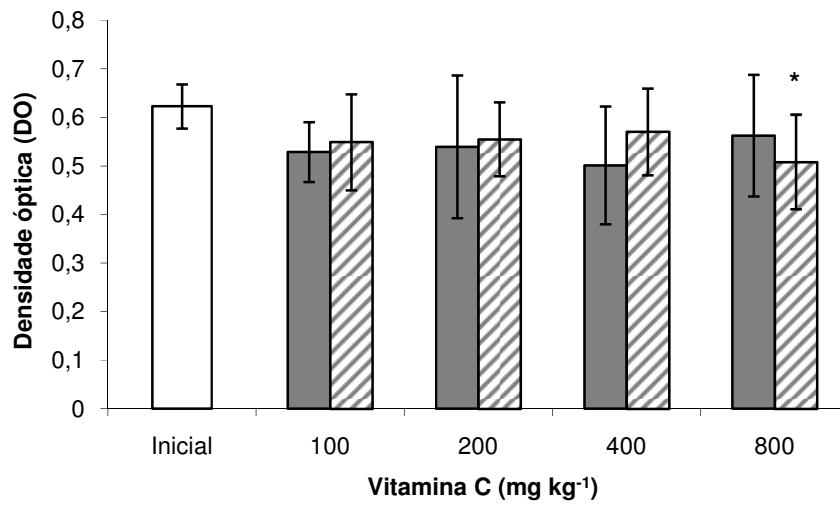


Figura 3. Médias \pm desvio padrão da atividade respiratória de leucócitos de pacu em seis (■) e 12 (▨) semanas de alimentação suplementada com vitamina C (Tukey, 5%). * indica diferença estatística entre tratamento e valor inicial.

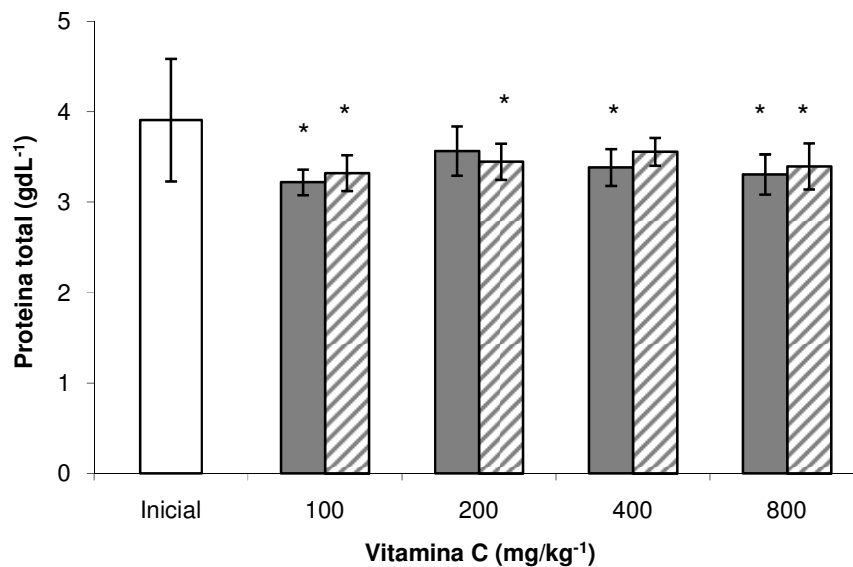


Figura 4. Médias \pm desvio padrão da concentração de proteína total sérica de pacu em seis (■) e 12 (▨) semanas de alimentação suplementada com vitamina C (Tukey, 5%). * indica diferença estatística entre tratamento e valor inicial.

5.2. Indicadores hematológicos

As médias do hematócrito no pacu, em seis semanas de alimentação experimental, apresentaram diferença estatística apenas quando comparadas com a inicial, independente dos tratamentos. Esse efeito desapareceu em 12 semanas de alimentação (Figura 5A). O mesmo comportamento foi observado em relação ao número de eritrócitos. As médias deste parâmetro, em seis semanas de alimentação experimental, foram estatisticamente maiores que a média inicial independente da concentração de vitamina utilizada (Figura 5B).

Em relação ao VCM, as médias apresentaram valores mais baixos que a média inicial no tratamento 200, em seis semanas, e tratamento 800, em seis e 12 semanas. Em ambos os casos, não houve diferença na comparação entre tratamentos (Figura 5C).

No caso da HGB, houve diferença significativa na comparação com a média inicial e os tratamentos 200 e 800 em seis semanas, e com as médias do tratamento 800 em 12 semanas. Na comparação entre tratamentos, houve diferença estatística apenas em 12 semanas entre 100 e 400g/kg de vitamina C, tendo o último apresentado a maior média (Figura 5D). O perfil da resposta da hemoglobina foi semelhante ao perfil do hematócrito e número de eritrócitos, indicando que o aumento do HCT foi devido ao aumento no número de células e não no volume das mesmas.

Não houve interação entre os tratamentos (concentrações de vitamina) e o tempo de administração (seis e 12 semanas) nos parâmetros hematológicos.

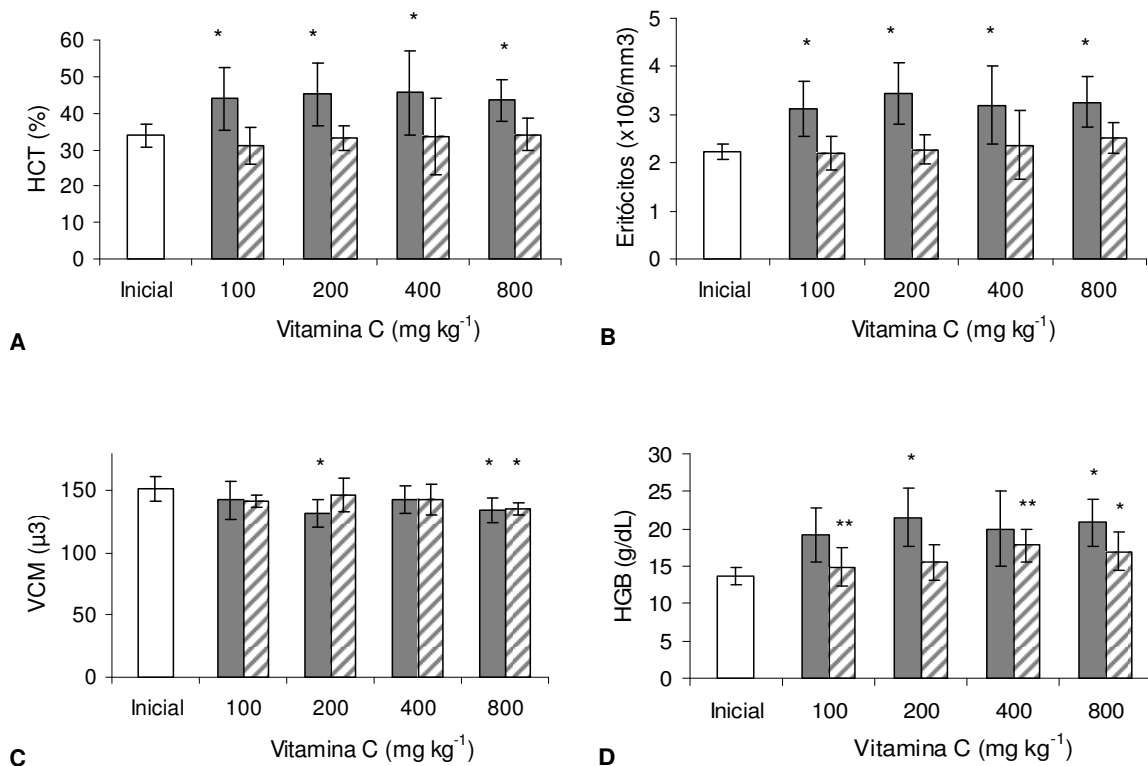


Figura 5. Médias \pm desvio padrão do hematócrito (A), número de eritrócitos (B), volume corpuscular médio (C) e concentração de hemoglobina (D) de pacu em seis (■) e 12 (▨) semanas de alimentação suplementada com vitamina C (Tukey, 5%). * indica diferença estatística entre tratamento e valor inicial e ** indica diferença estatística entre tratamentos.

5.3. Indicadores zootécnicos

As médias de ganho de peso (Figura 6), conversão alimentar (Figura 7) e fator de condição (Figura 8), em seis e 12 semanas de alimentação, não apresentaram diferença estatística quando comparadas entre tratamentos e tempos de coleta, porém é possível observar diferenças numéricas na comparação entre coletas em todos os parâmetros, tendo a coleta de 12 semanas apresentado valores melhores.

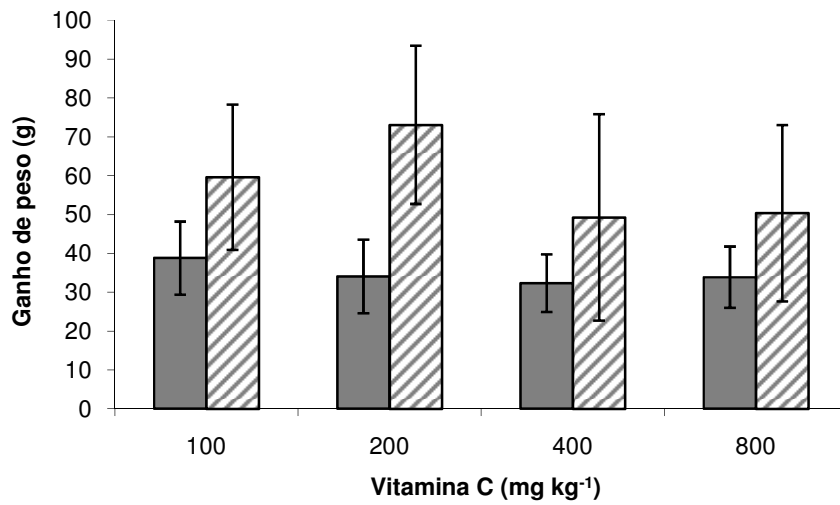


Figura 6. Médias \pm desvio padrão do ganho de peso de pacu em seis (■) e 12 (▨) semanas de alimentação suplementada com vitamina C (Tukey, 5%).

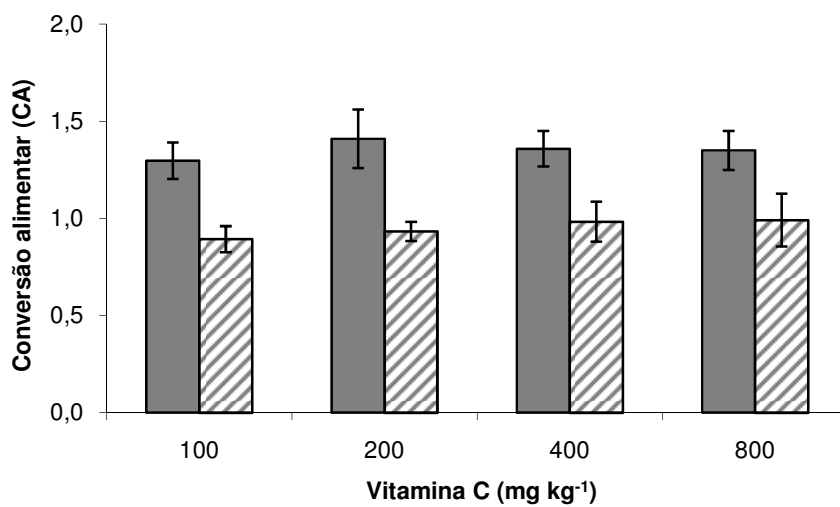


Figura 7. Médias \pm desvio padrão da conversão alimentar (CA) de pacu em seis (■) e 12 (▨) semanas de alimentação suplementada com vitamina C (Tukey, 5%).

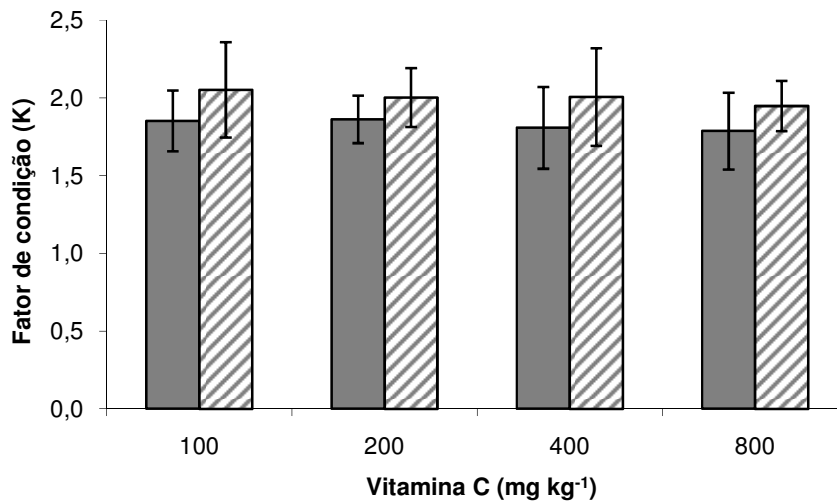


Figura 8. Médias \pm desvio padrão do fator de condição (K) de pacu em seis (■) e 12 (▨) semanas de alimentação suplementada com vitamina C (Tukey, 5%).

6. RESULTADOS - Experimento 2

No segundo experimento, peixes alimentados por 12 semanas com quatro níveis de vitamina C (mg kg^{-1}) na ração (100, 200, 400, 800) foram infectados por *Aeromonas hydrophila* e amostrados antes e uma semana após o desafio com a bactéria. Além da mortalidade cumulativa, foram analisados, como indicadores imunológicos, a atividade respiratória de leucócitos, concentração de lisozima sérica, atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento e proteína total sérica. Como indicadores hematológicos foram analisados hematócrito (HCT), contagem de eritrócitos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina (HGB), contagem total de leucócitos, trombócitos e eritrócitos jovens.

6.1. Mortalidade cumulativa.

No período de observação de sete dias, após a inoculação dos peixes com a suspensão de bactérias, não houve mortalidade em nenhum tratamento. Nenhum sinal característico da infecção por *Aeromonas hydrophila* foi observado no mesmo período.

6.2. Atividade respiratória de leucócitos

Embora não tenha ocorrido diferença estatística, observa-se uma diminuição numérica da atividade respiratória de leucócitos na comparação antes e após o desafio. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém observa-se que o tratamento 800 apresentou as menores médias na comparação entre tratamentos, tanto antes como após o desafio (Figura 9).

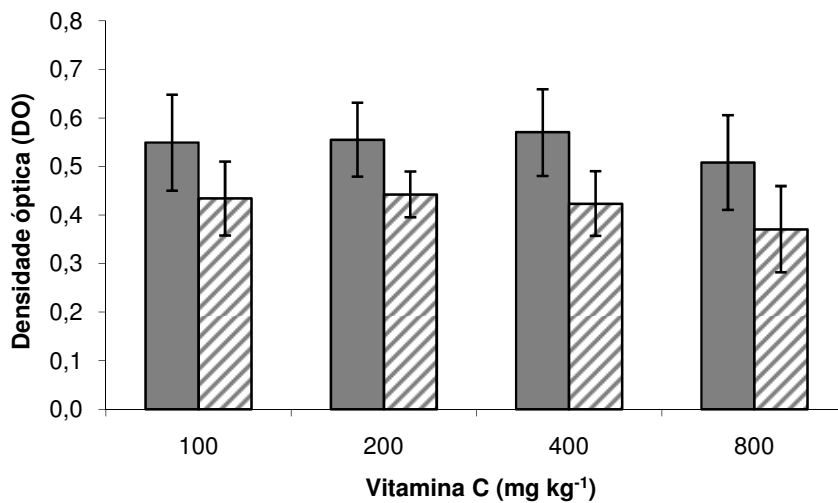


Figura 9. Médias \pm desvio padrão da atividade respiratória de leucócitos de pacu alimentado por 12 semanas com dieta suplementada com vitamina C e infectado com *A. hydrophila*, antes (■) e uma semana (▨) após o desafio (Tukey, 5%).

6.3. Concentração de lisozima sérica

Não houve diferença estatística entre as médias de concentração de lisozima sérica, tanto na comparação entre as amostragens feitas antes e após desafio quanto na comparação entre tratamentos (Figura 10). Observa-se uma tendência de aumento em todos os tratamentos após desafio com *Aeromonas hydrophila*, exceto no tratamento 200 mg kg⁻¹.

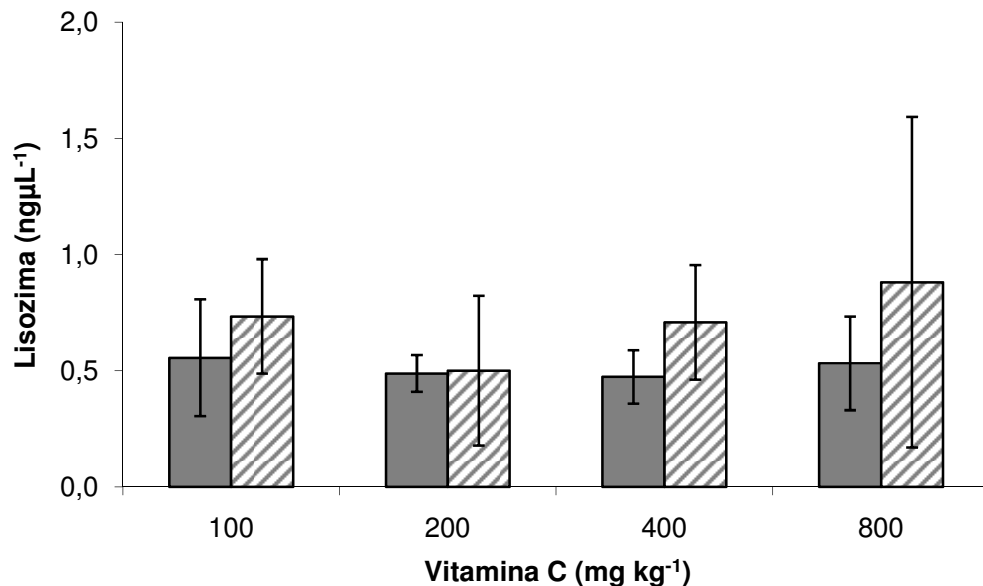


Figura 10. Médias \pm desvio padrão da concentração de lisozima sérica de pacu alimentado por 12 semanas com dieta suplementada com vitamina C e infectado com *A. hydrophila*, antes (■) e uma semana (▨) após o desafio (Tukey, 5%).

6.4. Atividade hemolítica do sistema complemento – Via alternativa

Não houve diferença estatística entre as médias da atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento, tanto na comparação das amostragens feitas

antes e após desafio quanto na comparação entre tratamentos (Figura 11). Observa-se diminuição numérica em todos os tratamentos após desafio com *Aeromonas hydrophila*.

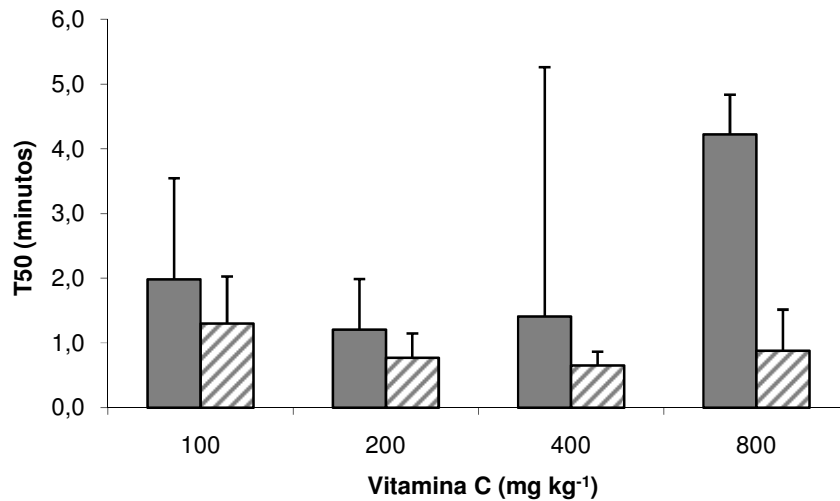


Figura 11. Médias \pm desvio padrão da atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento de pacu alimentado por 12 semanas com dieta suplementada com vitamina C e infectado com *A. hydrophila*, antes (■) e uma semana (▨) após o desafio (Tukey, 5%).

6.5. Proteína total sérica

Não houve diferença estatística entre as médias de proteína total sérica, tanto na comparação entre as amostragens feitas antes e após o desafio quanto na comparação entre tratamentos (Figura 12). Observa-se aumento numérico em todos os tratamentos após o desafio com *Aeromonas hydrophila*.

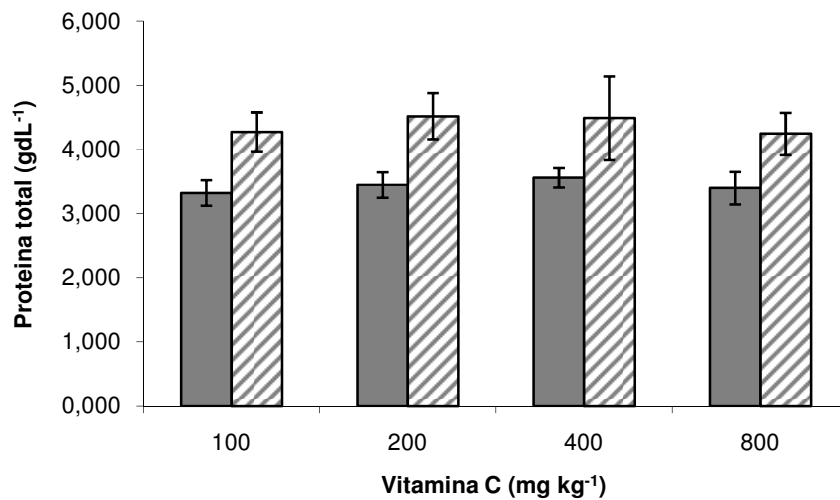


Figura 12. Médias \pm desvio padrão de proteína total sérica de pacu alimentado por 12 semanas com dieta suplementada com vitamina C e infectado com *A. hydrophila*, antes (■) e uma semana (▨) após o desafio (Tukey, 5%).

6.6. Indicadores hematológicos

As médias de hematócrito não apresentaram diferença significativa na comparação entre os tratamentos e antes ou após o desafio, porém apresentaram tendência semelhante a observada para as médias do número de eritrócitos (Figura 13A).

Não foi observada diferença estatística entre as médias de número de eritrócitos tanto na comparação entre tratamentos quanto nas amostragens feitas antes e uma semana após o desafio, porém observa-se tendência de aumento em todos os tratamentos após o desafio com a bactéria, exceto no tratamento 400 mg kg⁻¹ (Figura 13B).

Com relação ao volume corpuscular médio, as médias não apresentaram diferença significativa tanto na comparação entre os tratamentos quanto entre as amostragens feitas antes e uma semana após o desafio. Observa-se, porém uma

tendência de diminuição numérica em todos os tratamentos após o desafio com *Aeromonas hydrophila* (Figura 13C).

No caso da HGB, a resposta seguiu o mesmo perfil da contagem de eritrócitos, mas as diferenças foram significativas. Foi observada diferença entre as médias de concentração de hemoglobina entre os tratamentos 100 e 400 após 12 semanas de alimentação, tendo o segundo apresentado o maior valor. Na comparação das amostragens feitas antes e uma semana após o desafio, foi observada diferença nos tratamentos 100 e 200. Nos dois casos, as médias após o desafio apresentaram valores maiores (Figura 13D).

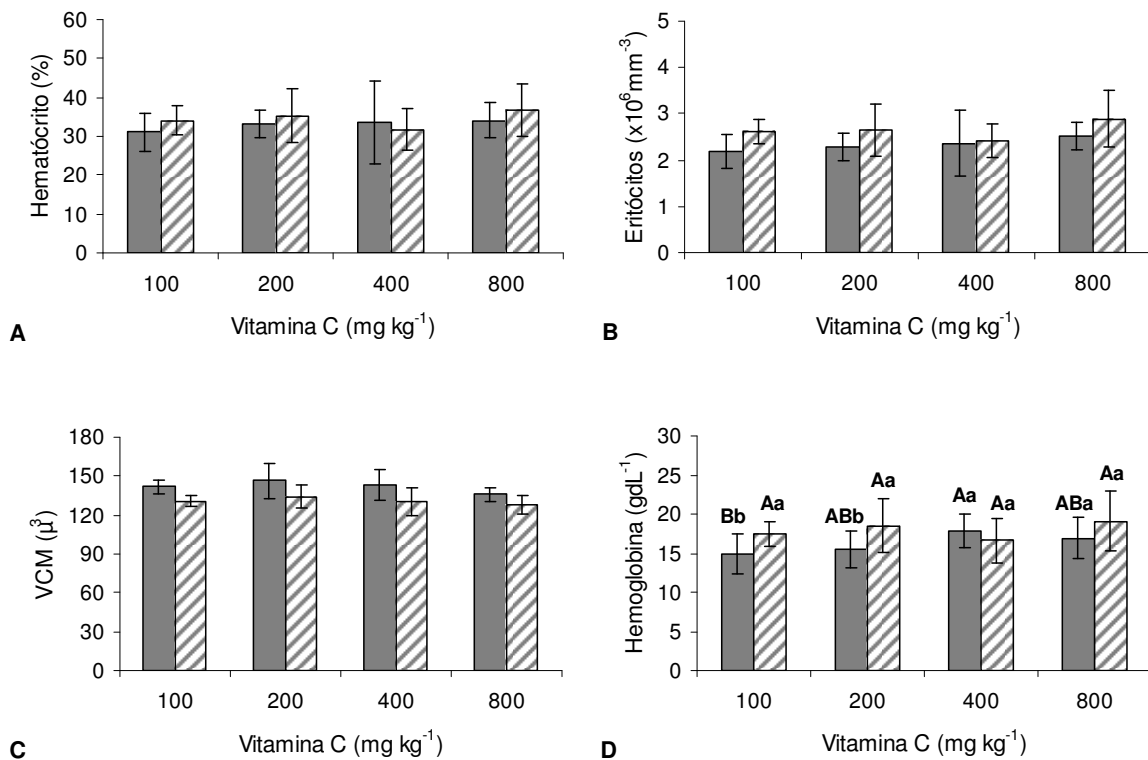


Figura 13. Médias ± desvio padrão do hematócrito (A), número de eritrócitos (B), volume corpuscular médio (C) e concentração de hemoglobina (D) de pacu alimentado

por 12 semanas com dieta suplementada com vitamina C e infectado com *A. hydrophila*, antes (■) e uma semana (▨) após o desafio (Tukey, 5%). Letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos e minúsculas entre coletas.

6.7. Número de leucócitos

Não houve diferença no número de leucócitos tanto na comparação entre os tratamentos quanto entre as amostragens feitas antes e uma semana após o desafio. As médias apresentaram valores maiores a partir do tratamento 100, tendo apresentado valores numericamente menores uma semana após desafio com *Aeromonas hydrophila* (Figura 14).

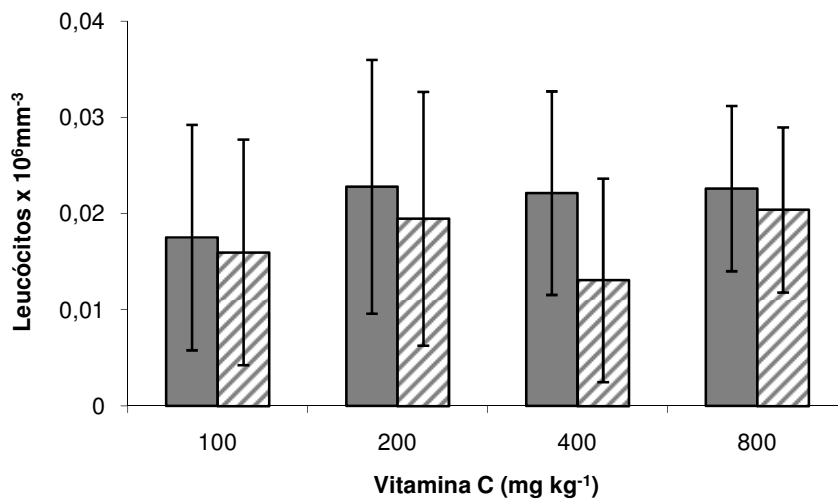


Figura 14. Médias \pm desvio padrão de contagem total de leucócitos de pacu alimentado por 12 semanas com dieta suplementada com vitamina C e infectado com *A. hydrophila*, antes (■) e uma semana (▨) após o desafio (Tukey, 5%).

6.8. Número de trombócitos

As médias do número de trombócitos não apresentaram diferença estatística tanto na comparação entre tratamentos quanto na comparação entre as amostragens

feitas antes e uma semana após o desafio. Observa-se uma tendência de aumento numérico dose-dependente para as médias registradas na amostragem feita após 12 semanas de alimentação experimental (Figura 15)

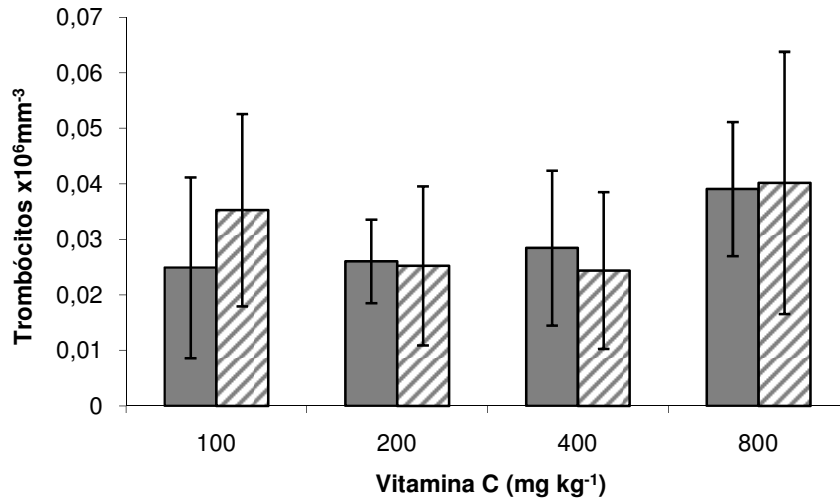


Figura 15. Médias \pm desvio padrão do número de trombócitos de pacu alimentado por 12 semanas com dieta suplementada com vitamina C e infectado com *A. hydrophila*, antes (■) e uma semana (▨) após o desafio (Tukey, 5%).

6.9. Número de eritrócitos jovens

Não houve diferença estatística na comparação das médias de eritrócitos jovens, tanto para tratamentos quanto para coletas (Figura 16). A variação entre as médias foi muito grande.

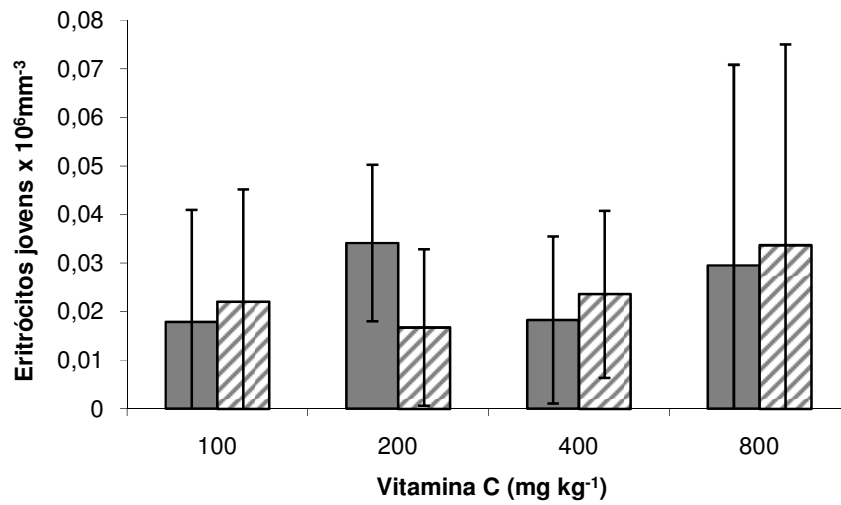


Figura 16. Médias \pm desvio padrão do número de eritrócitos jovens de pacu alimentado por 12 semanas com dieta suplementada com vitamina C e infectado com *A. hydrophila*, antes (■) e uma semana (▨) após o desafio (Tukey, 5%).

7. DISCUSSÃO

A piscicultura tem crescido como atividade econômica e em consequência poderá se beneficiar da pesquisa e da aplicação de tecnologias que garantam a saúde e bem estar dos peixes. A suplementação de dietas com imunostimulantes tem mostrado resultados positivos na minimização de perdas devido a doenças e tem suprido algumas limitações presentes no uso de quimioterápicos e vacinas. Dentre as substâncias com características imunostimulantes, destacam-se as vitaminas C e E, que têm sido bastante estudadas (Robertsen, 1999; Sakai, 1999; Raa, 2000).

Estudos têm investigado a ação de substâncias com atividade estimuladora do sistema imune inato de peixes brasileiros (Jensch-Junior et al., 2006), especialmente do pacu (Belo et al., 2005; Abreu et al., 2006 a, b; Affonso, 2006; Abreu et al., 2009; Biller et al., submetido).

Os níveis de vitaminas C e E incluídos nas dietas do presente estudo foram escolhidos com base em estudos de Chagas e Val (2003), Menezes et al. (2006) e Garcia et al. (2007). As evidências de um sinergismo e interação nas ações das vitaminas C e E (Mulero et al., 1998; Güney et al., 2007; Ortuno et al., 2001; Uzunhisarciki et al., 2007; Yildirim-Aksoy et al., 2008) motivaram a escolha de um nível fixo de vitamina E (250mg kg^{-1}), que foi adicionado a todas as dietas com a intenção de otimizar e evidenciar os efeitos da vitamina C.

No primeiro experimento (Experimento 1) (alimentação com as dietas experimentais por seis e 12 semanas), a avaliação dos indicadores imunológicos (atividade respiratória de leucócitos e proteína total) não evidenciou perfil que indicasse efeito dos tratamentos aplicados nos peixes. No caso dos indicadores hematológicos, as diferenças observadas em seis semanas de tratamento, com aumento de hematócrito, número de eritrócitos e hemoglobina, não dependeram da concentração de vitamina C utilizada. Nenhuma alteração significativa foi observada no desempenho zootécnico após seis ou 12 semanas de tratamento, porém observa-se diferença numérica na comparação entre as coletas seis e 12 semanas, sendo que os valores da segunda apresentam-se melhores. O ocorrido pode ser explicado pela melhor

adaptação dos peixes às condições ambientais e manejo experimental com 12 semanas.

No segundo experimento (Experimento 2), o desafio pela inoculação da *Aeromonas hydrophila* não desencadeou alterações significativas nos indicadores testados e nenhuma mortalidade foi registrada, em nenhuma das concentrações de vitamina C utilizadas. Estes resultados podem ser consequência de boas condições gerais de nutrição e saúde dos peixes, ou por baixa patogenicidade da cepa da bactéria utilizada. As diferenças nos resultados que expressam tendências de respostas serão destacadas nesta discussão, quando forem relevantes.

O nível de vitamina E incluído nas dietas (250mg kg^{-1}) pode ter influenciado as respostas imunológicas aproximando-as em todos os tratamentos. Segundo Garcia et al. (2007), que testaram três níveis de vitamina C e ou E (zero, 250 e 500mg k^{-1}) em dietas para juvenis de pacu, não observaram diferença na sobrevivência dos peixes após desafio com *Aeromonas hydrophila*, ou seja, os animais que receberam apenas vitamina E enfrentaram o desafio da mesma forma que os animais que receberam as duas vitaminas ou apenas a vitamina C. De acordo com Yildirim-Aksoy et al. (2008), em *Ictalurus punctatus*, na ausência da vitamina C, a vitamina E protegeu os peixes contra os sinais clássicos da deficiência de vitamina C.

Outros estudos apontam a vitamina E como possível estimulador da imunidade não específica em peixes. Exemplares de *Sparus auratus* foram alimentados com dietas suplementadas apenas com vitamina C (3 g kg^{-1}), apenas com vitamina E ($1,2\text{ g kg}^{-1}$) ou ainda com ambas vitaminas (Ortuno et al., 2001). Os resultados mostraram que a suplementação com vitamina C aumentou a atividade respiratória dos leucócitos, enquanto a suplementação com vitamina E aumentou a atividade fagocítica e do sistema complemento. Todos os efeitos positivos também foram encontrados nos peixes alimentados com dieta suplementada pelas duas vitaminas, apontando para o sinergismo de ação entre elas.

Adicionalmente, Pearce et al. (2003) observaram incremento na atividade sérica do sistema complemento em truta (*Oncorhynchus mykiss*) associado ao aumento da inclusão de vitamina E na dieta, embora os benefícios da suplementação acima dos

valores recomendados para a espécie não tenham sido comprovados. A suplementação da dieta de pacu com vitamina E foi associada, por Belo et al. (2005), ao recrutamento de macrófagos e eficiência da resposta inflamatória dos peixes. A concentração que promoveu melhor resposta foi a de 450mg kg^{-1} .

De acordo com Sakai (1999), a administração de imunoestimulantes por longos períodos de tempo pode provocar um feedback negativo nos peixes, provocando efeitos reversos aos desejados ou retornando o sistema imune ao ponto de partida. Este mecanismo poderia explicar a ausência de diferença em todos os parâmetros analisados, quando a comparação foi feita entre seis e 12 semanas de alimentação com as dietas suplementadas com vitamina C, como observado no Experimento 1. Neste caso, haveria influência do tempo de administração.

A produção de espécies reativas de oxigênio, geradas pela atividade respiratória de leucócitos, é um mecanismo bactericida que tem um papel importante no controle da infecção por patógenos e resistência a doenças (Sharp e Secombes, 1993; Verlhac et al., 1998). As células fagocitárias de defesa orgânica exercem importante função na modulação do sistema imune inato pela fagocitose e conseqüente destruição do patógeno. Durante o processo da fagocitose, ocorre aumento do consumo do oxigênio molecular, mecanismo conhecido como “burst” oxidativo, resultante da redução do oxigênio em ânion superóxido. Este, por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, por sua vez, por ação da enzima mieloperoxidase (MPO) liberada pelos leucócitos granulares, se transforma em hipoclorito levando à produção de cloraminas. Todas estas espécies reativas de oxigênio (EROs) contribuem ativamente para a destruição do patógeno, pois são substâncias oxidantes que atuam sobre membranas de microorganismos (Verlhac et al., 1998).

A única alteração observada na atividade respiratória de leucócitos de pacu foi uma redução nos peixes alimentados com 800 mg kg^{-1} , por 12 semanas, em relação aos valores iniciais. No desafio com a bactéria, também se observou valores mais baixos neste tratamento, mas a redução foi apenas numérica. Segundo Güney et al. (2007) e Uzunhisarciki et al. (2007), a vitamina C atua na redução de processos

oxidativos, atividade esta que pode ser potenciada quando combinada com a vitamina E, devido ao sinergismo da ação das duas vitaminas. A concentração de 800 mg kg^{-1} , somada a quantidade de vitamina E utilizada, pode ter inibido o processo oxidativo produzido pelos leucócitos.

A contagem de leucócitos, referente ao número total de células de defesa, mostrou uma tendência de valores mais elevados a partir da administração de 100 mg kg^{-1} , antes do desafio, mas após a inoculação com a *Aeromonas hydrophila*, esses valores apresentaram-se levemente mais baixos nestes mesmos tratamentos. Este perfil pode expressar uma resposta dos peixes à situação estressante de manuseio, exposição aérea e injeção intraperitoneal da suspensão bacteriana, a que os animais foram submetidos, mas não mostra proteção da resistência orgânica pelas vitaminas administradas. Em situações estressantes, como consequência da liberação de cortisol pelo tecido interrenal, ocorre redução de células brancas no sangue e diminuição de suas funções (Barton e Iwama, 1991).

Muitas moléculas que atuam na resposta imune inata podem ser utilizadas como marcadores no monitoramento da saúde dos peixes e na avaliação do efeito de imunostimulantes (Robertsen, 1999).

A concentração de proteína total sérica foi considerada um indicador imunológico por representar a concentração de todas as proteínas circulantes. Além da albumina, que é um componente expressivo da proteína total, estão presentes no sangue as imunoglobulinas, a lisozima e as proteínas do sistema complemento, que integram o sistema imune. Os valores de proteína total tenderam a aumentar após o desafio com a bactéria, indicando resposta aumentada do sistema imunológico quando na presença da bactéria. O perfil da resposta encontrada neste estudo pode indicar uma reação do sistema imune ao desafio, uma vez que acompanha os perfis observados na concentração de lisozima e da via alternativa do sistema complemento sérico após desafio com a *Aeromonas hydrophila*. O mesmo não foi relatado por Boon et al. (1990) e por Garcia et al. (2007), que apontaram diminuição da proteína total sérica em infecções por parasitas e bactérias. A diferença pode estar na capacidade natural de resposta imunológica dos peixes nos diferentes estudos.

A concentração de lisozima sérica é um índice importante na avaliação da imunidade inata, uma vez que a proteína, que tem origem em leucócitos, se encontra amplamente distribuída nos fluídos corporais dos peixes e tem ação lítica, tanto contra bactérias Gram positivas quanto negativas (Saurabh e Sahoo, 2008). No presente estudo, o nível de lisozima sérica mostrou uma tendência de elevação após o desafio com a *Aeromonas hydrophila*, nos peixes alimentados com 100, 400 e 800 mg kg⁻¹. Considerando a origem leucocitária da enzima, o perfil apresentado pode indicar maior atividade de leucócitos após o desafio, uma vez que, no mesmo período, ocorreu uma diminuição no número destas células. Esta resposta pode estar relacionada a uma possível reação do organismo à inoculação do patógeno. Não houve diferença significativa na comparação entre tratamentos, resultado semelhante ao encontrado por Misra et al. (2007) em carpas indianas (*Labeo rohita*) alimentadas com dietas contendo zero, 100, 200 e 500 mg kg⁻¹ de vitamina C.

As proteínas da via alternativa do sistema complemento, que, em peixes, é uma via mais ativa que a clássica (Koppenheffer, 1987), são componentes importantes da resposta imune inata, pois desempenham uma função importante na primeira resposta contra patógenos, principalmente devido a sua ação lítica. O sistema complemento é constituído por um conjunto de 35 proteínas solúveis no plasma, que atua nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias além de ser considerado um dos principais mediadores do processo inflamatório (Secombes, 1996; Claire et al., 2002; Boshra e Sunyer, 2006).

Em estudo com carpa indiana (*Labeo rohita*) alimentados com dietas suplementadas com quatro níveis de vitamina C (zero, 100, 200 e 500 mg kg⁻¹), Misra et al. (2007) observaram aumento da atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento em relação à dieta sem vitamina (controle), porém sem diferença entre tratamentos. O mesmo foi observado no presente estudo e, embora não tenha ocorrido diferença estatística, houve uma redução do T₅₀, tempo necessário para uma lise de 50% de suspensão de hemácias de coelho após a inoculação com *Aeromonas hydrophila*, o que parece indicar um aumento da concentração e/ou atividade das

proteínas da via alternativa do sistema complemento. Este perfil é semelhante ao encontrado por Biller et al. (submetido) em pacus que receberam dietas suplementadas com o imunostimulante β -glucano e foram desafiados por *Aeromonas hydrophila*.

Os eritrócitos e a hemoglobina estão relacionados com o transporte de oxigênio para atender a demanda energética dos tecidos. O perfil da resposta da hemoglobina dos pacus foi semelhante ao perfil do hematócrito e número de eritrócitos, indicando que o aumento do HCT foi devido ao aumento no número de células. A HGB aumentada está ligada ao aumento de células que a transportam para os tecidos. Estes aumentos foram observados na sexta semana de alimentação, mas não estão relacionados às concentrações de vitamina, podendo estar ligados a algum outro fator não controlado, ao qual os peixes foram expostos na ocasião da amostragem. Affonso et al. (2007) observaram aumento da concentração de hemoglobina em matrinxãs (*Brycon amazonicus*) alimentados com dietas suplementadas com 800 mg kg⁻¹ de vitamina C por oito semanas, diferentemente dos resultados obtidos neste estudo.

Os pacus não apresentaram sinais de infecção por *Aeromonas hydrophila*. Caso houvesse demanda energética aumentada pelo estresse, na ocasião do desafio, a condição poderia estar refletida nas variáveis hematológicas, mas não foi o que aconteceu confirmando a resistência orgânica e a boa condição de saúde dos peixes.

Nenhum nível de vitamina C afetou o crescimento dos peixes ou a utilização do alimento oferecido, em seis ou em 12 semanas de tratamento. Os resultados dos índices zootécnicos confirmam a indicação da boa condição nutricional e de saúde dos peixes que não dependeram de suplementação vitamínica para o desempenho zootécnico. De acordo com Yildirim-Aksoy et al. (2008), a suplementação da dieta de *Ictalurus punctatus* com 100 mg kg⁻¹ de vitamina C e 23 mg kg⁻¹ de vitamina E promoveu um bom desempenho de crescimento, e, na ausência da vitamina C, a vitamina E protegeu os peixes contra os sinais clássicos da deficiência de vitamina C, mas não afetou o crescimento. Já em *Labeo rohita*, a suplementação da dieta com vitamina C, em doses mais altas que a recomendada, por oito semanas, proporcionou melhora no crescimento e eficiência alimentar (Misra et al., 2007), o que não foi observado no presente estudo.

8. CONCLUSÃO

De acordo com o protocolo experimental utilizado, não foi possível observar com clareza efeitos da suplementação vitamínica nos indicadores biológicos testados. As respostas similares dos peixes nos diferentes tratamentos sugerem uma boa condição prévia dos animais, sem necessidade de estimulação extra. Entretanto, isso não exclui a necessidade de futuros estudos para o entendimento do mecanismo de ação do sistema imune do pacu frente a condições adversas que estimulem as respostas de resistência orgânica dos peixes, bem como o papel das vitaminas e outras substâncias como imunoestimulantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1101-1109, 2004.

ABREU, J.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L.M.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, 2009.

ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Efeito do beta 1,3 glicano, administrado intraperitonealmente e pela dieta, no perfil hematológico de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) **Anais do Congresso Aquacultura 2006**. Bento Gonçalves - RS, 2006a.

ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Prevenção do estresse de captura em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com beta 1,3 glicano **Anais do Congresso Aquacultura 2006**. Bento Gonçalves - RS, 2006b.

AFFONSO, E.G.; SILVA, E.D.; TAVARES-DIAS, M.; ENEZES, G.C.; CARVALHO, C.S.M.; NUNES, E.D.S.; ITUASSU, D.R.; ROUBACH, R.; ONO, E.A.; FIM, J.D.I.; MARCON, J.L. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 2, p. 383-388, 2007.

AFFONSO, S.F. **Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo**. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.

AI, Q.H.; MAI, K.S.; ZHANG, C.X.; XU, W.; DUAN, Q.Y.; TAN, B.P.; LIUFU, Z.G. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v. 242, n. 1-4, p. 489-500, 2004.

ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M. et al. (Ed.). **Diseases in Asian aquaculture II**. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, 1995. p. 185-202.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish**. 4. ed. Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd, 2007.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Disease**, v. 1, p. 3-26, 1991.

BELO, M.A.A.; SCHALCH, S.H. C.; MORAES, F.R.; SOARES, V.E.; OTOBONI, A.M.M.B.; MORAES, J.E.R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, n. 2-3, p. 146-154, 2005.

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

BILLER, J.D. **Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano**

Dissertação (Mestrado) - Zootecnia, Universidade estadual paulista Jaboticabal, 2008.

BILLER, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; URBINATI, E.C. Dietary beta-glucan enhances survival and some immune parameters of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, (submetido).

BOON, J.H.; CANNAERTS, V.M.H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M.A.M.; DECHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective larvae of *anguillicola-crassus* on hematological parameters of European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, v. 87, n. 3-4, p. 243-253, 1990.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J. O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 239-262, Feb 2006.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Efeito da vitamina c no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 397-402, 2003.

CHU, W. H.; LU, C. P. In vivo fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 152-155, 2008.

CLAIRE, M.; HOLLAND, H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 399-420, 2002.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C.; DA CRUZ-HOFLING, M. A. Morphological study of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **Biocell**, v. 27, n. 3, p. 319-328, 2003.

DALMO, R.A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, n. 4, p. 241-273, 1997.

DIAS-KOBERSTEIN, T.C.R.D.; CARNEIRO, D.J.; URBINATI, E.C. Tempo de trânsito gastrointestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 3, p. 413-417, 2005.

ELLIS, A.E. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. In: PICKERING, A.D. (Ed.). **Stress and Fish**. London: Academic Press, 1981. p. 147-165.

ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S. et al. (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1990. p. 101-104.

FERNANDES, J. B. K., CARNEIRO, D. J., SAKOMURA, N. K. Sources and levels of crude protein in diets for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fingerlings. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v.29, n.3, p.646-653. 2000.

FRACALOSSO, D.M.; ALLEN, M.E.; YUYAMA, L.K.; OFTEDAL, O.T. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. **Aquaculture**, v. 192, n. 2-4, p. 321-332, 2001.

FREGADOLLI, C.H. Laboratory analysis of predation by cyclopoid copepods on first-feeding larvae of cultured Brazilian fishes. **Aquaculture**, v. 228, n. 1-4, p. 123-140, 2003.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E.M.; DE MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 39-46, 2007.

GODOY, D.T.; MIAN, G.F.; ZANOLO, R.; YUHARA, T.Y.; FARIA, F.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. **Aquaculture**, v. 285, p. 255-259, 2008.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil: Subordem Charachoidei, Bacia do Rio Mogi Guaçu**. Piracicaba: Franciscana, 1975.

GUNEY, M.; ORAL, B.; DEMIRIN, H.; OZGUNER, M.; TAKE, G.; MUNGAN, T.; ALTUNTAS, I. Evaluation of caspase-dependent apoptosis during methyl parathion-induced endometrial damage in rats: Ameliorating effect of Vitamins E and C. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 221-227, 2007.

HALVER, J.E.. The Vitamins in HALVER, J.E. and. HARDY, R.W (Ed). **Fish Nutrition** San Diego, CA, USA, Academic Press, 2002, , pp. 61-141

HERNÁNDEZ, A.; TORT, L. Annual variation of complement, lysozyme and haemagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15 p. 479-481, 2003.

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. In: BROWN, L. (Ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1993. Cap.14. p. 233-247.

ISEKI, K.K.; CORREA, S.A.; NEGRÃO, J.A.; CASTRUCI, A.M.L. Seasonal changes in LH and 17 α -estradiol levels in the freshwater teleost *Piaractus mesopotamicus*. **World Aquaculture 2003, Book of Abstracts**. Salvador, BA, 2003. p. 368.

JENSCH-JUNIOR, B.E.; PRESSINOTTI, L.N.; BORGES, J.C.S.; SILVA, J.R.M.C. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Aquaculture**, v. 251, p. 509- 515, 2006.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 277-287, 2003.

KOPPENHEFFER, T. L. Serum complement system of ectothermic vertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 11, p. 279-286, 1987.

KRIEGER, M. H. A.; DELATTRE, E.; CAROLSFELD, J.; CECCARELLI, P.; MENEZES, F. V. A time-coursed study of physiological indicators of handling stress in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 1019-1022, 1989.

MARTINS, M.L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 655-658, May 1998.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; SILVA, C.A.H.; SCHALCH, S. H.C. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes. A survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 23-28, 2000.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; BOZZO, F.R.; PAIVA, A.M.F.C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of Sao Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 24, n. 4, p. 981-985, 2002.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; POLIZELLO, A.C.; AZZOLINI, A.E.; LUCISANO VALIM, Y.M. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunological Investigations**, v. 28(2-3), p. 89-101, 1999.

MATAQUEIRO, M.I.; NAKAGHI, L.S.O.; SOUZA, J.P.; CRUZ, C.; OLIVEIRA, G.H.; URBINATI, E.C. Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, n. 1, p. 124-127, Feb 2009

MENEZES, G.C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; ANDRADE, J.I.A.; BRASIL, E.M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C.; MARCON, J.L.; AFFONSO, E.G. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, n. A, p. 274-279, 2006.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PRADHAN, J. Effects of dietary vitamin C on immunity, growth and survival of Indian major carp *Labeo rohita*, fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 35-44, 2007.

MOREAU, R.; DABROWSKI, K. Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 3, p. 733-745, 2000.

MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, n. 2, p. 185-199, 1998.

OLIVEIRA, A.M.B.M.S.; CONTE, L.; CYRINO, J.E.P Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J. E. P. et al (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 217-238.

ORTUNO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, n. 3-4, p. 167-180, 2001.

PEARCE, J.; HARRIS, J.E.; DAVIES, S.J. The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 337-340, 2003.

PEMBERTON, J.M.; KIDD, S.P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **Fems Microbiology Letters**, v. 152, n. 1, p. 1-10, 1997.

PETREIRE JR, M. River fisheries in Brazil: a review. **Regulated Rivers: Research and Management**, v. 4, p. 1-16, 1989.

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

POLHILL, R.B.; NEWMAN, S.L.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON, R.B. Kinetic Assessment of Alternative Complement Pathway Activity in a Hemolytic System .2. Influence of Antibody on Alternative Pathway Activation. **Journal of Immunology**, v. 121, n. 1, p. 371-376, 1978.

POST, G. **Fish Health**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1987.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de piscicultura tropical**. Brasília: IBAMA, 1994.

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

RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: CRUZ -SUÁREZ, L. E. et al. (Ed.). **Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. Mérida, Yucatán, Mexico., 2000.

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 269-290, 1999.

ROMAGOSA, E.; DEPAIVA, P.; GODINHO, H.M. Pattern of oocyte diameter frequency-distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (*Colossoma mitrei* Berg 1895), Induced to Spawn. **Aquaculture**, v. 86, n. 1, p. 105-110, 1990.

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

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p. 95-103.

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

SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. The Determination of Lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v. 58, n. 6, p. 731-736, 1949.

SOUZA, V.L.; OLIVEIRA, E.G.; URBINATI, E.C. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 15, p. 371-379, 2000.

TAKAHASHI, L.S.; BALDAN, A.P.; URBINATI, E.C. Growth performance and energetic metabolism of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), fed diets supplemented with ammonium metavanadate. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 13, p. 1372-1377, 2006.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P. *et al* (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. Cap.6. p. 171-194.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas com potencial para a piscicultura**. Santa Maria: Editora U. Federal de Santa Maria, 2005. p. 225-246.

UZUNHISARCIKLI, M.; KALENDER, Y.; DIRICAN, K.; KALENDER, S.; OGUTCU, A.; BUYUKKOMURCU, F. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, p. 115-122, 2007.

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

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 2003.

VIJAYAVEL, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; THILAGAM, H.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Dietary ascorbic acid and alpha-tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in the thornfish *Terapon jarbua*. **Science of the Total Environment**, v. 372, n. 1, p. 157-163, 2006.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WHYTE, S.K. The innate immune response of finfish e A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1127-1151, 2007.

XIE, Z.G.; NIU, C.J.; ZHANG, Z.B.; BAO, L. Dietary ascorbic acid may be necessary for enhancing the immune response in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), a species capable of ascorbic acid biosynthesis. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 2, p. 152-157, Oct 2006.

YILDIRIM-AKSOY, M.; LIM, C.; LI, M.H.; KLESIUS, P.H. Interaction between dietary levels of vitamins C and E on growth and immune responses in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture Research**, v. 39, n. 11, p. 1198-1209, 2008.