

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**
Programa Integrado de Pós-graduação em
Biologia Tropical e Recursos Naturais

**Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e
como mitigador do estresse ao transporte em matrinxã
(*Brycon amazonicus*)**

SARAH RAGONHA DE OLIVEIRA

**Manaus, Amazonas
Junho, 2008**

SARAH RAGONHA DE OLIVEIRA

**Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e
como mitigador do estresse ao transporte em matrinxã
(*Brycon amazonicus*)**

Orientador: Dra. Elizabeth Gusmão Affonso

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais – PPG-BRTN/INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

**Manaus, Amazonas
Junho, 2008**

Oliveira, Sarah Ragonha de

Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse de transporte do matrinxã (*Brycon amazonicus*) / Sarah Ragonha de Oliveira

Manaus: INPA/UFAM

2008

101 p. ilustr.

Dissertação (mestrado) – INPA/2008 – Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1. Piscicultura 2. Fisiologia 3. Imunoestimulante

CDD

Sinopse:

Estudou-se o efeito da suplementação do levamisol, imunoestimulante, na dieta do matrinxã sob condições experimentais e como amenizador das respostas de estresse causadas pelo transporte.

Parâmetros zootécnicos e fisiológicos foram analisados.

Palavras-chave:

Piscicultura, fisiologia, imunoestimulação.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Sônia e Israel, e ao meu irmão, Lucas, pelo amor, compreensão e pelo incentivo para seguir em frente durante mais uma etapa de minha vida.

Ao Rondon que, ao meu lado, se dedicou a esse trabalho com cumplicidade, paciência e muito amor, em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sônia e Israel, pela confiança que sempre depositarem em mim, por me apoiarem em todas as minhas vontades e decisões e por acreditarem em mim.

À minha orientadora, Dr^a Elizabeth Gusmão Affonso, pelos ensinamentos durante todas as fases de desenvolvimento deste trabalho, pela dedicação, disposição e incentivo para vencer os obstáculos, a buscar sempre o melhor para realização de cada tarefa. Obrigada pela confiança, paciência e, principalmente, pela amizade.

Ao amigo Eduardo Ono, pelos conselhos e inúmeros ensinamentos que contribuíram grandemente para a minha formação profissional. Obrigada por toda a ajuda, intelectual e pessoal, que me ofereceu durante a elaboração e execução desse trabalho. Agradeço também à sua família, Lia, Enry e Juliana, pela amizade e por compartilharem comigo a sua vida.

Ao meu namorado Rondon Yamane, que se dedicou inteiramente a este trabalho e cuja ajuda foi fundamental para a sua realização. Obrigada pela disposição, pela compreensão, pelo incentivo, pela paciência, principalmente, e pelo seu amor.

À Dr^a Marisa Narciso Fernandes que, gentilmente, cedeu as dependências do seu laboratório no Departamento de Ciências Fisiológicas (UFSCar/São Carlos) para as análises de íons e cortisol, e a Marise Sakuragui, pela orientação e ajuda durante as análises.

Ao Dr. Marcos Tavares-Dias, Dr. Jaydione Luiz Marcon e seu aluno Adriano Teixeira de Oliveira, pela ajuda oferecida para coloração e leitura dos esfregaços sanguíneos.

Aos alunos e estagiários do Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura, pela assistência durante a execução dos experimentos e análises laboratoriais: Edinael Sousa, Érica Santiago, Glauber Menezes, Jaqueline Andrade, Monyza Muniz, Renato Sousa, Eduardo Braga, Márcio Quara, Mariana Amaral, Patrícia Maciel, Andréa Almeida e Dryelle Galvão.

Agradeço em especial, à Elenice Brasil pelo apoio técnico, pela paciência para me ensinar e me acompanhar durante as análises laboratoriais, e à Talísia Martins, pela grande ajuda oferecida para a leitura das lâminas.

Aos funcionários e amigos da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura – CPAQ – do INPA, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desse trabalho.

Ao curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior (BADPI), em especial a Dr^a Ângela Varela, e também a Carminha Arruda e Elany Cristina, pelo apoio efetivo na minha formação como Mestre.

Aos meus colegas de turma do BADPI-2006, pela amizade, companheirismo durante as disciplinas e por compartilharem conhecimentos importantes à minha formação.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por abrir suas portas e contribuir para a minha formação profissional.

À Vetbrands, em especial ao Sr. Jorge Couto Pimentel, pela doação do cloridrato de levamisol utilizado neste trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de estudos no mestrado.

À todos aqueles que tornaram possível esta conquista, obrigada.

RESUMO

No presente trabalho foram realizados três estudos com o objetivo de avaliar a eficácia do levamisol incorporado à dieta, para a melhoria do desempenho zootécnico e como mitigador do estresse do matrinxã, *Brycon amazonicus*. No primeiro estudo (Capítulo 2), foi determinada a tolerância do matrinxã à bactéria *Aeromonas hydrophila*, por meio da DL₅₀ 96-h (dose letal para 50% da população em 96 horas), para aplicação nos testes de desafios. Os resultados mostraram que o matrinxã é altamente tolerante a infecção causada por essa bactéria, apresentando a DL₅₀ 96-h igual a $6,66 \times 10^{11}$ células/mL de solução salina. No segundo estudo (Capítulo 3), foram avaliados os efeitos da ingestão de diferentes concentrações de levamisol no desempenho e nas respostas fisiológicas do matrinxã em condições experimentais, e após desafio com 60% da DL₅₀ 96-h de *A. hydrophila*. Os resultados mostraram que a ingestão de levamisol em baixas dosagens, embora não tenha influenciado no ganho de peso e no consumo de ração, estimulou parte do sistema imune não-específico do matrinxã, não sendo capaz, porém, de minimizar as alterações fisiológicas provocadas pela infecção bacteriana. Finalmente, no terceiro estudo (Capítulo 4), foi avaliado o efeito da suplementação de 100 mg de levamisol/kg de dieta, por diferentes períodos, nas respostas de estresse do matrinxã após o transporte. Os resultados sugerem que a suplementação com levamisol não foi capaz de minimizar os efeitos fisiológicos negativos causados pelo transporte, podendo ainda, apresentar efeito imunossupressor sobre leucócitos e trombócitos. Entretanto, os efeitos do estresse demonstraram a capacidade adaptativa desta espécie em recuperar a homeostase fisiológica, sendo os períodos mais críticos as primeiras 24 h de recuperação após o transporte.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, imunoestimulante, matrinxã, transporte.

ABSTRACT

In the present work three experiments were carried out in order to evaluate the effects of dietary levamisole supplementation on growth performance and its efficacy to mitigate stress in matrinxã, *Brycon amazonicus*. In the first experiment (Chapter 2), the tolerance of matrinxã to *Aeromonas hydrophila* was verified, through the 96-h LD₅₀ (lethal dose for 50% of the population in 96 hours), to be applied in the challenge test. The results suggest that matrinxã is tolerant to *A. hydrophila* infection, presenting a 96-h LD₅₀ value of 6.66×10^{11} cells/mL of saline solution. A second study was done (Chapter 3) to evaluate the effects of levamisole ingestion on growth performance and on physiological responses of matrinxã under experimental conditions, and after the challenge with 60% of the 96-h LD₅₀ of *A. hydrophila*. The results showed although levamisole has no effect on growth performance of matrinxã under experimental conditions, low dietary levels can stimulate part of the non-specific immune system. However, the ingestion of levamisole does not mitigate the physiological alterations caused by the bacterial infection. In the third experiment (Chapter 4), the effects of supplementing 100 mg levamisole/kg diet, for different periods, on the stress responses of matrinxã after a 5-hour transport was evaluated. The results suggest that levamisole supplementation did not mitigate the negative effects caused by the transport stress. In addition, levamisole presented an immunosuppressive effect on leukocytes and trombocytes. However, the effects of stress observed in all the fish (from treatments with and without levamisole supplementation) demonstrated the adaptative capacity of this species, in which the most critical period was the first 24 hours after transport.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, immunostimulant, matrinxã, transportation.

SUMÁRIO

Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse ao transporte em matrinxã (*Brycon amazonicus*)

REVISÃO DE LITERATURA

1 Situação atual da Aqüicultura	1
2 Estresse em Sistema de Cultivo	2
3 Imunoestimulantes	5
4 A espécie <i>Brycon amazonicus</i>	7
5 Referências bibliográficas	10

OBJETIVOS	20
-----------------	----

CAPÍTULO 2 - Tolerância do matrinxã (*Brycon amazonicus*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila*.

RESUMO	21
ABSTRACT	22
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Origem das bactérias e preparo das suspensões bacterianas	24
2.2 Delineamento experimental	24
2.3 Monitoramento da qualidade de água	25
2.4 Análise estatística	25
3 RESULTADOS	26
3.1 Qualidade da água	26
3.2 Mortalidade dos peixes e dose letal (DL ₅₀) de <i>Aeromonas hydrophila</i> para o matrinxã	26
4 DISCUSSÃO	27
4.1 Qualidade da água	27
4.2 Dose letal (DL ₅₀) de <i>A. hydrophila</i> para o matrinxã	28
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

CAPÍTULO 3 - Efeito da suplementação de levamisol nas respostas fisiológicas e no desempenho do matrinxã, *Brycon amazonicus*

RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Delineamento Experimental	40
2.1.1 Avaliação da eficiência da suplementação de diferentes doses de levamisol na ração do matrinxã, tendo como indicadores os índices de desempenho e as condições fisiológicas dos peixes	40
2.1.2 Avaliação do efeito de diferentes concentrações de levamisol na ração do matrinxã após infecção com <i>A. hydrophila</i>	41
2.2 Preparo da ração suplementada com levamisol	41
2.3 Coleta e análises de sangue	42
2.4 Monitoramento da qualidade da água	44
2.5 Parâmetros zootécnicos	44
2.6 Análises estatísticas	45
3 RESULTADOS	45
3.1 Qualidade da água	45
3.2 Efeito da suplementação de diferentes concentrações de levamisol na dieta do matrinxã	46
3.3 Efeito de diferentes concentrações de levamisol na dieta do matrinxã após infecção com <i>A. hydrophila</i>	49
4 DISCUSSÃO	52
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

CAPÍTULO 4 - Efeito da suplementação de levamisol no estresse por transporte de matrinxã, *Brycon amazonicus*

RESUMO	66
ABSTRACT	67
1 INTRODUÇÃO	67
2 MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Delineamento Experimental	69

2.2 Preparo da ração suplementada com levamisol	70
2.3 Monitoramento da qualidade da água	70
2.4 Coletas de sangue e análises	71
2.5 Análises estatísticas	72
3 RESULTADOS	72
4 DISCUSSÃO	82
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES	100

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - Tolerância do matrinxã (*Brycon amazonicus*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila*.

- Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água durante as 96 horas de experimento para determinação da DL₅₀ da *A. hydrophila* para *B. amazonicus* 30
- Tabela 2. Mortalidade do matrinxã, *B. amazonicus*, após 96 h de inoculação peritoneal de diferentes concentrações de *A. hydrophila* 30

CAPÍTULO 3 - Efeito da suplementação de levamisol nas respostas fisiológicas e no desempenho do matrinxã, *Brycon amazonicus*

- Tabela 1. Qualidade da água dos tanques durante o experimento com juvenis de matrinxãs alimentados com rações suplementadas com diferentes doses de levamisol por 45 dias 46
- Tabela 2. Parâmetros sangüíneos do matrinxã alimentado com ração suplementada com diferentes doses de levamisol durante 45 dias 49

CAPÍTULO 4 - Efeito da suplementação de levamisol no estresse por transporte de matrinxã, *Brycon amazonicus*

- Tabela 1. Oxigênio dissolvido (OD), temperatura, condutividade elétrica (CE), pH amônia total (NH₃+NH₄⁺), amônia não ionizada (NH₃), nitrito (NO₂⁻), dióxido de carbono (CO₂), alcalinidade total (AT) e dureza total (DT) da água de cultivo do matrinxã (*B. amazonicus*) nos diferentes tratamentos 73

Tabela 2. Oxigênio dissolvido (OD), temperatura, condutividade elétrica (CE), pH amônia total ($\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$), amônia não ionizada (NH_3), nitrito (NO_2^-), dióxido de carbono (CO_2), alcalinidade total (AT) e dureza total (DT), da água após 5 h de transporte do matrinxã (*B. amazonicus*) 73

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Diagrama dos estressores químicos, físicos e ambientais que atuam sobre os peixes e induzem respostas fisiológicas, agrupadas em primárias, secundárias e terciárias 5

Figura 2. Exemplar de matrinxã (*Brycon amazonicus*) 9

CAPÍTULO 2 - Tolerância do matrinxã (*Brycon amazonicus*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila*.

Figura 1. Erosão das nadadeiras e perda de escamas causadas por infecção por *Aeromonas hydrophila* 31

Figura 2. Lesão ulcerativa no olho de *Brycon amazonicus* causada por *Aeromonas hydrophila* 31

Figura 3. Lesões ulcerativas no abdômen e poro urogenital de *Brycon amazonicus* causadas por *A. Hydrophila* 31

Figura 4. Exoftalmia e excesso de muco na região da cabeça de *Brycon amazonicus* causados por *Aeromonas hydrophila* 32

CAPÍTULO 3 - Efeito da suplementação de levamisol nas respostas fisiológicas e no desempenho do matrinxã, *Brycon amazonicus*

Figura 1. Ganho de peso médio individual (GPMI) e consumo médio de ração individual (CMRI) de matrinxãs alimentados com rações suplementadas com diferentes doses de levamisol durante 45 dias 47

Figura 2. Ganho de peso médio individual diário (GPMID) e consumo diário de ração (CDR) de matrinxãs alimentados com rações suplementadas com diferentes doses de levamisol durante 45 dias	47
Figura 3. Taxa de crescimento específico – TCE (A), conversão alimentar aparente – CAA (B), e sobrevivência (C) de matrinxãs alimentados rações suplementadas com diferentes doses de levamisol durante 45 dias	48
Figura 4. Parâmetros sangüíneos do matrinxã alimentado com rações suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (Pré-desafio) e após 7 e 14 dias do desafio com <i>A. hydrophila</i>	51
Figura 5. Níveis de glicose (A) e proteínas totais – Pt (B) do matrinxã alimentado com rações suplementadas com diferentes concentrações de levamisol após 7 e 14 dias do desafio com <i>A. hydrophila</i>	52
 CAPÍTULO 4 - Efeito da suplementação de levamisol no estresse por transporte de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>	
Figura 1. Valores médios de cortisol (A) e glicose (B) em matrinxãs (<i>B. amazonicus</i>) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas	75
Figura 2. Valores médios de eritrócitos - RBC (A), hematócrito - Ht (B) e concentração de hemoglobina - [Hb] (C) em matrinxãs (<i>B. amazonicus</i>) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas	76
Figura 3. Volume corpuscular médio - VCM (A) e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM (B) em matrinxãs (<i>B. amazonicus</i>) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas	78

- Figura 4. Valores médios de leucócitos - WBC (A) e trombócitos (B) em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas 79
- Figura 5. Valores médios de proteínas totais (Pt) em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas 80
- Figura 6. Valores médios de cloreto - Cl^- (A), sódio - Na^+ (B) e potássio - K^+ (C) - em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas 81

REVISÃO DE LITERATURA

Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse ao transporte em matrinxã (*Brycon amazonicus*).

1 Situação atual da Aqüicultura

A crescente demanda por alimentos pela população mundial e a diminuição dos estoques pesqueiros têm contribuído para o crescimento da aqüicultura global. Segundo a FAO (2006), a aqüicultura contribui com 59,4 milhões de toneladas para a produção de alimentos e apresenta grande potencial para atender a crescente demanda por pescado, que deverá alcançar 80 milhões de toneladas em 2030.

Embora a maior parte da produção aqüícola mundial esteja concentrada na China (69,6%) e outros países da Ásia e região do Pacífico (21,9%), os países da América Latina e região do Caribe, que produzem apenas 2,3% da aqüicultura mundial, têm apresentado a maior média de crescimento anual (21,3%) desta atividade, estando principalmente concentrada no Equador, Chile e Brasil (FAO, 2006; 2007).

No Brasil, as regiões Sul, Sudeste e Nordeste são as que detêm maior produção e conhecimento técnico-científico sobre a aqüicultura no país (Roubach et al., 2003). Entretanto, a região amazônica tem sido vista como uma das regiões mais promissoras para o avanço da piscicultura do Brasil, cuja produção no ano de 2004 apresentou o maior crescimento (24,5%), comparada às demais regiões do país (FAO, 2004; IBAMA, 2004).

A piscicultura na região amazônica teve seu início na década de 80, com a implantação do Programa de Desenvolvimento da Aqüicultura pelo governo do Estado do Amazonas. Desde então esta atividade vem crescendo e se expandindo em toda a região Norte (Roubach et al., 2003; Ono, 2005). Três características fundamentais encontradas na região indicam o grande potencial que esta possui para o desenvolvimento da piscicultura: a grande extensão da Bacia Amazônica brasileira, o clima quente o ano todo e com pequena amplitude térmica (apenas 3 a

4 °C nos grandes corpos d'água) e a ampla variedade de espécies de peixes de alto valor comercial (Ono, 2005).

Apesar das características favoráveis para o desenvolvimento da aqüicultura na região, ainda existem obstáculos para o incremento da piscicultura na Amazônia, tais como: baixa densidade populacional; relativa abundância dos estoques pesqueiros naturais; isolamento regional que dificulta o acesso aos principais mercados consumidores; difícil acesso aos insumos, principalmente nas cidades mais distantes; carência de informações sobre a biologia e cadeia produtiva das principais espécies; baixo nível tecnológico da maioria das pisciculturas instaladas na região e a resistência à adoção de novas técnicas; deficiência ou ausência de serviços de assistência técnica, entre outros (Petrere Jr., 2001; Freitas, 2003; Ono, 2005).

Entretanto, esforços têm sido feitos por diferentes setores da sociedade (governos municipal, estadual e federal, instituições de pesquisa e de ensino, agências financiadoras e empreendedores), que vêem na aqüicultura reais possibilidades desta atividade se tornar agente do desenvolvimento sustentável da região (Ono, 2005). Exemplo disto são os inúmeros projetos de pesquisa que têm como objetivo fornecer tecnologia para o cultivo das espécies nativas de maior interesse da piscicultura na região, tais como: o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Roubach et al., 2003; FAO, 2004; Brandão et al., 2005; Ono, 2005), que são as duas principais espécies cultivadas na região e, mais recentemente, o pirarucu (*Arapaima gigas*) que apresenta grande potencial para a produção de pescado (Ono et al., 2003).

2 Estresse em Sistema de Cultivo

Em sistemas intensivos de cultivo, os peixes são freqüentemente expostos a inúmeros estressores, como altas densidades populacionais, alterações na qualidade da água, práticas de manejo em geral, tratamento de doenças e interações biológicas entre peixes e microrganismos. Estes estressores estimulam os animais a ajustarem seus mecanismos fisiológicos adaptativos (Figura 1), cujas respostas podem ser ou não eficientes, dependendo do tempo de exposição às

condições consideradas desfavoráveis e da intensidade da exposição (Wedemeyer, 1996).

A definição de estresse pode ser bastante ampla. De maneira geral, o estresse pode ser definido como um conjunto de respostas do organismo animal, diante de estímulos desagradáveis, agressivos e ameaçadores. Tais respostas são ativadas pelo sistema nervoso central, que percebe o estímulo agressor, e pelo sistema hormonal, que organiza a defesa biológica, chamada de resposta ao estresse (Urbinati & Carneiro, 2004).

Estas respostas são didaticamente divididas em respostas primárias, secundárias e terciárias (Wedemeyer, 1996; Wendelaar-Bonga, 1997; Barton, 2002; Urbinati & Carneiro, 2004). As respostas primárias são mediadas pelo sistema neuro-endócrino com a liberação instantânea dos hormônios de estresse, catecolaminas e cortisol, para a circulação. As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) são sintetizadas e liberadas por células cromafins e o cortisol pelas células interrenais. As respostas secundárias compreendem efeitos fisiológicos associados ao estresse e mediados por estes hormônios. Destacam-se a hiperglicemia, alterações nas concentrações de íons no sangue, o aumento do conteúdo de água do tecido, o aumento da taxa metabólica, as alterações hematológicas, entre outras (Mazeaud et al., 1977; Eddy, 1981; McDonald & Milligan, 1997; Wendelaar-Bonga, 1997). As respostas terciárias afetam o animal e a população como um todo, comprometendo o crescimento, a resistência a doenças e o sucesso reprodutivo (Wendelaar-Bonga, 1997; Urbinati & Carneiro, 2004).

Na criação intensiva, entre as várias práticas de manejo às quais os peixes estão submetidos e que são consideradas estressantes, estão: a densidade de estocagem, a alimentação, a captura, as interações sociais e, por fim, o transporte, que é uma das fontes de estresse mais adversas presentes na piscicultura.

O transporte de peixes vivos é uma prática rotineira em sistemas de criação de peixes que tem como finalidade a transferência dos animais a diferentes destinos, como: outras unidades de produção dentro da mesma propriedade, outras pisciculturas destinadas à engorda ou formação de plantel de matrizes, povoamento de lagos destinados à pesca esportiva, comércio de peixes ornamentais, indústria de beneficiamento de pescados, entre outros (Carmichel et al., 2001; Lim et al., 2003; Gomes & Urbinati, 2005). Em qualquer uma destas atividades, os peixes devem

chegar ao seu destino em boas condições de saúde e atender aos critérios de qualidade do comprador. Embora seja prática freqüente na piscicultura, o transporte é considerado traumático e gerador de estresse que expõe os peixes a estímulos responsáveis por uma cadeia de respostas fisiológicas. Tais estímulos incluem captura, adensamento, manipulação, transporte e liberação nos tanques de destino (Urbinati et al., 2004; Inoue, 2005). As respostas fisiológicas ao transporte, que podem ser tanto imediatas quanto tardias, incluem alterações associadas às respostas secundárias de estresse, além de aumento da suscetibilidade à infestação de parasitas, aparecimento de doenças e até morte (Wedemeyer, 1996).

O manejo adequado é a chave para o sucesso do transporte, dependendo, principalmente, dos procedimentos e das técnicas preparatórias relacionadas ao peixe, à água, aos equipamentos e ao manejo envolvido na operação (Grøttum et al., 1997; Kubitzka, 2003). A utilização de algumas técnicas no pré e pós-transporte têm minimizado os efeitos adversos causados por este manejo, como: restrição alimentar antes do transporte, adição de substâncias na água de transporte (anestésicos, cloreto de sódio, sulfato de cálcio, cloreto de cálcio, entre outros), trocas da água durante o transporte por outra de melhor qualidade, densidade de peixes, etc. (Kubitzka, 1999; Carneiro & Urbinati, 2002; Gomes & Urbinati, 2005; Gomes et al., 2006).

Entretanto, tais procedimentos, muitas vezes não são suficientes para impedir a mortalidade dos peixes após o transporte, causada, principalmente, pela ação de patógenos oportunistas. Isto ocorre porque os peixes, sob condições de estresse, apresentam diminuição de sua resistência imunológica (Jeney et al. 1997; Köllner et al., 2002). O uso de aditivos na dieta dos peixes, como imunoestimulantes, semanas antes do transporte, pode prevenir os efeitos negativos do estresse e, conseqüentemente, diminuir a taxa de mortalidade (Jeney et al., 1997; Volpatti et al., 1998; Lim et al., 2003; Palić et al., 2006).

Segundo Lim et al. (2003), a profilaxia nutricional dos peixes para o processo de transporte é técnica importante para o seu desempenho no pós-transporte. Condições que evitam a imunodepressão ou estimulam o sistema imune são essenciais para fornecer ao animal um estado saudável que permita suportar tais condições desfavoráveis. Substâncias imunoestimulantes, como as vitaminas, que fazem parte da composição das rações, e outras como, glicanas, quitosanas e o

levamisol podem ser utilizadas como suplemento alimentar e possuem papel importante no sistema imune e, portanto, são efetivas na prevenção de doenças em peixes (Montero et al., 1999; Findlay & Munday, 2000; Bricknell & Dalmo, 2005; Li et al., 2006; Magnadóttir, 2006; Menezes et al., 2006).

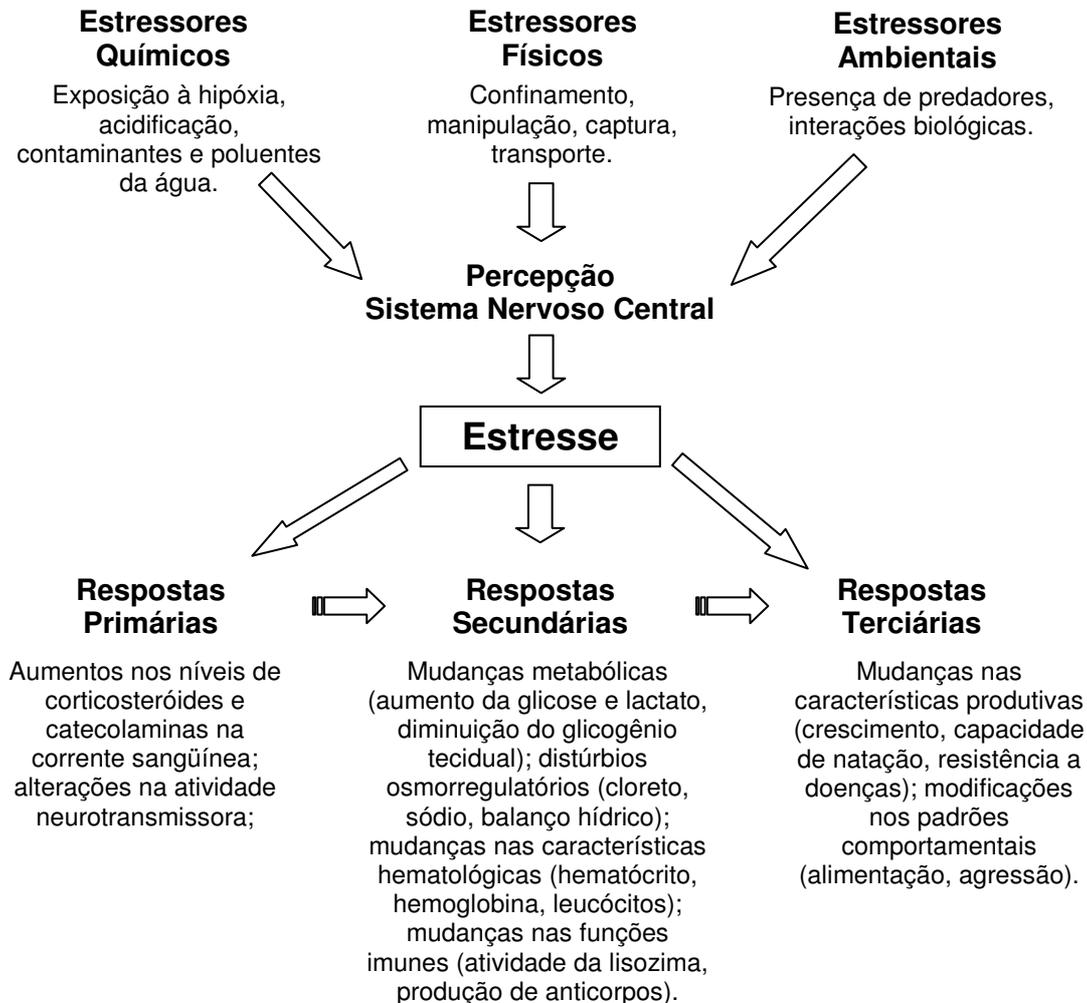


Figura 1. Diagrama dos estressores químicos, físicos e ambientais que atuam sobre os peixes e induzem respostas fisiológicas, agrupadas em primárias, secundárias e terciárias. Modificado de Barton, 2002.

3 Imunoestimulantes

Os imunoestimulantes compreendem um grupo de compostos biológicos ou sintéticos que melhoram os mecanismos de defesa não específicos e específicos dos animais. Essas substâncias são capazes de interagir com os leucócitos, ligando-

se aos receptores específicos presentes na superfície dessas células, iniciando sua ativação e aumentando a resistência à infecções do organismo (Anderson, 1992; Sakai, 1999; Raa, 2000). Diversos autores têm descrito seus efeitos positivos sobre o sistema imune dos peixes, como a ativação das células exterminadoras naturais e células T, a prevenção de doenças (Anderson, 1992; Gopalakannan & Arul, 2006; Sajid et al., 2006) e a modulação hematopoiética, que aumenta a produção de células vermelhas e brancas (Cox, 1988). Segundo Anderson (1992), as vantagens da imunoestimulação em peixes, não apenas incluem a promoção da resposta imune contra agentes infecciosos mais efetivos, mas também a superação dos efeitos supressivos do estresse.

Os imunoestimulantes em peixes podem ser administrados pelas vias intraperitoneal, oral ou tópica (imersão em banhos). Embora a injeção intraperitoneal seja a via mais eficiente, as outras formas de administração têm apresentado vantagens que as tornam alternativas potencialmente efetivas, tais como praticidade na aplicação em massa em peixes de diversos tamanhos, menor estresse de manejo, maior segurança e facilidade na administração (Selvaraj et al., 2006). Estas substâncias têm sido utilizadas rotineiramente na aquicultura mundial como medida profilática, principalmente porque não apresentam quaisquer efeitos negativos ao consumidor e ao meio ambiente, ao contrário dos antibióticos e das vacinas vivas (Secombes, 1994; Burrells et al., 2001a, b; Kumari & Sahoo, 2006; Li et al., 2006a).

Um potente imunoestimulante amplamente estudado em peixes é o levamisol. Essa substância, pertencente ao grupo dos imidazóis, foi inicialmente desenvolvida como anti-helmíntico, mas possui propriedades imunoestimuladoras. Em peixes, tem sido utilizada para melhorar as respostas imunes não específicas (Baba et al., 1993; Purzyc & Calkosinski, 1998; Gopalakannan & Arul, 2006).

O levamisol apresenta importante função no restabelecimento das funções normais das células efectoras do sistema imune (Sajid et al., 2006). Dentre os efeitos positivos descritos, podem se destacar: melhoria na função dos macrófagos e dos linfócitos T, redução da função da célula T supressora (Kumari & Sahoo, 2006), modulação da atividade citotóxica de leucócitos e da resposta de anticorpos (Cuesta et al., 2002), aumento da atividade fagocítica e dos fatores de ativação dos macrófagos (Mulero et al., 1998).

Inúmeros trabalhos descrevem ainda a capacidade do levamisol em melhorar a resistência dos peixes contra bactérias patogênicas, como *Vibrio anguillarum*

(Kajita et al., 1990), *Aeromonas hydrophila* (Baba et al., 1993; Gopalakannan & Arul, 2006), *Paramoeba* sp. (Munday & Zilberg, 2003), *Edwardsiella tarda* (Sahoo & Mukherjee, 2002) e nematódeos, como *Anguillicola crassus* (Geets et al., 1992).

Além das características imunoestimulantes, o levamisol ainda pode apresentar a vantagem de melhorar o crescimento dos peixes, como observado para *Sparus aurata* (Mulero et al., 1998), *Cyprinus carpio* (Gopalakannan & Arul, 2006) e para o híbrido *Morone chrysops* x *Morone saxatilis* (Li et al., 2006a). Outra característica importante dessa substância é sua administração por meio da dieta, o que possibilitaria sua aplicação pelas indústrias de ração, diferente dos tratamentos que utilizam injeções e imersões em banhos terapêuticos (Li et al., 2006b).

4 A espécie *Brycon amazonicus*

A espécie *Brycon amazonicus* (Spix & Agassis, 1829), conhecida como matrinxã (Figura 2), pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e gênero *Brycon*. O gênero *Brycon* abrange grande número de espécies distribuídas desde o sul do México até a parte mediana da Argentina (Lima, 2003), o que torna sua taxonomia confusa (Borges, 1986). Recentemente foi descoberto que a espécie *Brycon cephalus*, que ocorre na Amazônia brasileira e que é amplamente citada no Brasil, é na verdade *Brycon amazonicus*, e que a distribuição da espécie *Brycon cephalus* se restringe apenas ao alto rio Amazonas localizado no Peru e na Bolívia (Lima, 2003).

O matrinxã destaca-se como uma das espécies de grande valor econômico da ictiofauna amazônica e apresenta grande potencial para a criação intensiva (Graef, 1995; Honczaryk, 2000; Arbeláez-Rojas et al., 2002; Fim, 2002; Brandão et al., 2005). Diversos estudos sobre a biologia desta espécie têm sido descritos na literatura, entretanto, são ainda recentes aqueles que agregam este conhecimento para estabelecer diretrizes de pesquisas e ações conjuntas para o desenvolvimento do real potencial do gênero *Brycon* na piscicultura (Mendonça, 1994; Izel & Melo, 2003; Izel & Melo, 2004).

Na natureza, o matrinxã alcança de 3 a 4 kg, atingindo maturação sexual com três anos de idade, e sua reprodução ocorre no início do período da enchente, entre dezembro e fevereiro (Val & Honczaryk, 1995). Dentre as características da espécie para o cultivo estão: bom desempenho reprodutivo, mesmo em condições de clima

subtropical, hábito alimentar onívoro, crescimento rápido e boa aceitação de ração, adaptação a ambientes de confinamento, hábito voraz em resposta ao arraçoamento, além da ótima qualidade de carne e aceitação comercial (Mendonça, 1994; Val & Honczaryk, 1995; Guerra et al., 1996; Pezzato et al., 2000). Pode ainda, ser criado em sistema intensivo e semi-intensivo em monocultivo, ou policultivo com outras espécies. Em cativeiro, o matrinxã tem crescimento de 700 a 1000 g no primeiro ano e de 1300 a 1600 g no segundo ano, o que o torna espécie com grande potencial em sistema de cultivo (Izel & Melo, 2003). Recentes pesquisas revelam ainda que o cultivo intensivo do matrinxã em canal de igarapé pode ser uma alternativa promissora para a região, principalmente em pequenas propriedades. (Fim et al., 2001; Arbeláez-Rojas et al., 2002; Fim, 2002).

Esta espécie, embora bem adaptada ao cativeiro, é muito sensível ao manuseio e transporte. Isso é devido ao comportamento notadamente agitado, realizando movimentos extremamente vigorosos quando o seu espaço é reduzido nas redes de arrasto e caixas de transporte. Por ação dessa movimentação excessiva, observa-se grande perda de muco e escamas, facilitando a ocorrência de doenças que trazem prejuízos às pisciculturas (Inoue et al., 2003). Em função disto, podem apresentar alta mortalidade após práticas de manejo, consideradas essenciais na criação de peixes (Kubitza, 2003).

Diversos trabalhos descrevem técnicas para minimizar os efeitos do estresse no matrinxã decorrentes destas atividades, como o jejum, que pode variar de 24 a 48 horas antes do transporte (Carneiro & Urbinati, 2001a; Urbinati et al., 2004), ou a utilização de produtos na água de transporte, como o sal (Carneiro & Urbinati, 2001a), anestésicos como: benzocaína (Carneiro & Urbinati, 2001b; Urbinati & Carneiro, 2001; Inoue et al., 2002), fenoxietanol (Inoue et al., 2004), tricaína metano-sulfonato *MS222* (Roubach et al., 2001) e eugenol (Inoue et al., 2005). Embora o uso destes produtos minimize as respostas do estresse durante o transporte e, conseqüentemente, a taxa de mortalidade, os efeitos adversos destas respostas no pós-transporte ainda são problemáticos e devem ser superados.



Figura 2. Exemplar de matrinxã (*Brycon amazonicus*).

5 Referências Bibliográficas

- Anderson, P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2:281-307.
- Arbeláez-Rojas, G.A.; Fracalossi, D.M.; Fim, J.D.I. 2002. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(3), 1059-1069.
- Araújo-Lima, C.; Goulding, M. 1998. *Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, Tefé, Amazonas. 186 pp.
- Baba, T.; Watase, Y.; Yoshinaga, Y. 1993. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 301-307.
- Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 517-525.
- Borges, G.A. 1986. *Ecologia de três espécies do gênero Brycon (Muller – Troschel, 1844) (Pisces, Characidae), no rio Negro – Amazonas, com ênfase na caracterização taxonômica e alimentação*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 150pp.
- Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Araújo, L.D.; Silva, A.L.F. 2005. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(3): 299-303.

- Bricknell, I.; Dalmo, R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 457-472.
- Burrells, C.; Williams, P.D.; Forno, P.F. 2001a. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 1. Effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture*, 199: 159-169.
- Burrells, C.; Williams, P.D.; Southgate, P.J.; Wadsworth, S.L. 2001b. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 199: 171-184.
- Carmichel, G.J.; Tomasso, J.R.; Schwedler, T.E. 2001. Fish transportation. In: Wedemeyer, G.A. (Ed). *Fish hatchery management*. 2^a Ed. American Fisheries Society, Bethesda, p. 641-660.
- Carneiro, P.C.F.; Urbinati, E.C. 2001a. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquaculture Research*, 32: 297-304.
- Carneiro, P.C.F.; Urbinati, E.C. 2001b. Electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* following transport stress under benzocaine effect. *Journal of Applied Aquaculture*, 11: 1-13.
- Carneiro, P.C.; Urbinati E.C. 2002. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: characidae), at different densities. *Aquaculture International*, 10: 221-229.
- Cox, C.C. 1988. Examining the immunologic and hematopoietic properties of an immunoestimulant. *Veterinary Medicine*, 6: 424-428.
- Cuesta, A.; Meseguer, J.; Esteban, M. A. 2002. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89: 169-174.

- Eddy, F.B. 1981. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: Pickering, A.D. (Ed). *Stress and Fish*. Academic Press, Londres, p. 77–102.
- FAO. 2004. Inland Water Resources and Aquaculture Service (FIRI). Suplicy, F.M. *National Aquaculture Sector Overview - Brazil*. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. FAO – Rome, Disponível em: <http://www.fao.org/figis/servlet/static?dom=countrysector&xml=naso_brazil.xml>. Acesso em 19 set. 2006.
- FAO, 2006. *The State of World Fisheries and Aquaculture: 2006*. Fisheries Department, Roma, 150pp.
- FAO, 2007. *The State of World Fisheries and Aquaculture: 2006*. Fisheries Department, Roma, 180pp.
- Fim. J.D.I.; Randall. C.F.; Storti-Filho. A. 2001. *Cultivo intensivo e manejo de reprodutores de matrinxã, Brycon cephalus, em canal de igarapé*. Trabalho apresentado para concorrer ao prêmio FUCAPI/CNPq de tecnologia, 7ª ed.
- Fim, J.D.I. 2002. Criatório de matrinxã em igarapé. *Revista Agroamazônia, Região Norte do Brasil*, 1(1): 56.
- Findlay, V.L.; Munday, B.L. 2000. The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 358(23): 369-78.
- Freitas, C.E.C. 2003. Recursos Pesqueiros Amazônicos: status atual da exploração e perspectivas de desenvolvimento do extrativismo e da piscicultura. In: Melo, A.F. (Org). *O Futuro da Amazônia: Dilemas, Oportunidades e Desafios no Limiar do Século XXI*. 1ª Ed. Instituto Euvaldo Lodi, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio, Brasília, 1: 101-130.

- Geets, A.; Liewes, E.W.; Ollivier, F. 1992. Efficacy of some anthelmintics against the swimbladders nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13: 123-128.
- Gomes, L.C.; Urbinati, E.C. 2005. Matrinxã (*Brycon cephalus*). In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul. p. 149-174.
- Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Brinn, R.P.; Roubach, R.; Coppati, C.E.; Baldisserotto, B. 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture*, 256: 521-528.
- Gopalakannan, A.; Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255(1-4): 179-187.
- Graef, E.W. 1995. As espécies de peixes com potencial para criação no Amazonas. In: Val, A.L.; Honczaryk, A. (Eds). *Criando peixes na Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 38pp.
- Grøttum, J.A.; Staurnes, M.; Sigholt, T. 1997. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities, during transport. *Aquaculture Research*, 28: 159-164.
- Guerra, H.F.; Alcántara, F.B.; Campos, L.A. 1996. *Piscicultura amazonica con especies nativas*. Tratado de Cooperación Amazonica. TCA. Mirigraf. S.R.L. Lima, Peru. 169 pp.
- Honczaryk, A. 2000. O Potencial da matrinxã *Brycon cephalus* na piscicultura da Amazônia. In: *Conferência Internacional "Amazônia no Terceiro Milênio: Atitudes Desejáveis"*. 2000, Resumos... São Paulo: Associação Brasil SGI. CD-ROOM.

- IBAMA. 2004. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Estatística da Pesca 2004. Brasil Grandes Regiões e Entidades da Federação*. Brasília, Distrito Federal. 98pp.
- Inoue, L.A.K.A.; Santos-Neto, C.; Moraes, G. 2002. Benzocaína como anestésico de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Boletim Técnico do Cepta*, 15: 23-30.
- Inoue, L.A.K.A.; Santos-Neto, C.; Moraes, G. 2003. Clove oil as anesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, 33(5): 943-947.
- Inoue, L.A.K.A.; Santos-Neto, C.; Moraes, G. 2004. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1969): the use in field procedures. *Ciência Rural*, 34(2): 563-565.
- Inoue, L.A.K.A. 2005. *Respostas do matrinxã (Brycon cephalus) a anestésicos e estressores*. Dissertação de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 148pp.
- Inoue, L.A.K.A.; Afonso, L.O.B.; Iwama, G.K.; Moraes, G. 2005. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica*, 35(2): 289-295.
- Izel, A.C.U.; Melo, L.A.S. 2003. *Criação de matrinxã (Brycon amazonicus) em barragens no Estado do Amazonas*. Comunicado Técnico 20 – Embrapa Publicações. Manaus, Amazonas. 2pp.
- Izel, A.C.U.; Melo, L.A.S. 2004. *Criar matrinxã (Brycon amazonicus): atividade econômica potencial para o agronegócio amazonense*. Comunicado Técnico 20 – Embrapa Publicações. Manaus, Amazonas. 12 pp.
- Jeney, G.; Galeotti, M.; Volpatti, D.; Jeney, Z.; Anderson, D.P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154(1): 1-15.

- Kajita, Y.; Sakai, M.; Atsuta, S.; Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*, 25: 93-98.
- Köllner, B.; Wasserrab, B.; Kotterba, G.; Fischer, U. 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – how can environmental influences be detected? *Toxicology Letters*, 131: 83-95.
- Kubitza, F. 1999. *Técnicas de transporte de peixes vivos*. F. Kubitza, Jundiaí, São Paulo. 51pp.
- Kubitza, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. F. Kubitza, Jundiaí, São Paulo. 229pp.
- Kumari, J.; Sahoo, P. 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 37: 500-509.
- Li, P.; Wang, X.; Gatlin III, D.M. 2006a. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture*, 251: 201-209.
- Li, G.; Guo, Y.; Zhad, D.; Qian, P.; Sun, J.; Xiao, C.; Liang, L.; Wang, H. 2006b. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fucus*. *Aquaculture*, 253: 212-217.
- Lim, L.C.; Dhert, P.; Sorgeloos, P. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research*, 34(11): 923-935.
- Lima, F.C.T. 2003. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Orgs). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDPURCS, Porto Alegre. p. 174-181.

- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (Overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2): 137-151.
- Mazeaud, M.; Mazeaud, F.; Donaldson, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- Mcdonald, G.; Milligan, L. 1997. 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, Cambridge. p. 119–144.
- Mendonça, J.O.J. 1994. Criação de espécies do gênero *Brycon* no CEPTA / IBAMA. In: *Seminário sobre criação de espécies do gênero Brycon*. Pirassununga, Resumos... Pirassununga, CEPTA. p. 31-48.
- 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. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 145(2): 274-279.
- Montero, D.; Marrero, M.; Izquierdo, M.S.; Robaina, L.; Vergara, J.M.; Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus auratus*) juvenilis subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.
- Mulero, V.; Esteban, M.A.; Munoz, J.; Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunology*, 8: 49-62.

- Munday, B.L.; Zilberg, D. 2003. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(1): 3-6.
- Ono, E.A.; Roubach, R.; Pereira-Filho, M. 2003. Pirarucu production advances in central Amazon, Brazil. *Global Aquaculture Advocate*, 6(4): 44-46.
- Ono, E.A. 2005. Cultivar peixes na Amazônia: possibilidade ou utopia? *Panorama da Aqüicultura*, 90: 41-48.
- Palić, D.; Andreasen, C.B.; Herolt, D.M.; Menzel, B.W.; Roth, J.A. 2006. Immunomodulatory effects of β -glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Developmental Comparative Immunology*, 30(9): 817-830.
- Petrere Jr., M. 2001. *Desarrollo sostenible del área Amazonica Fronteriza. Brasil y Colômbia*. Report to Convenio OEA/Sinchi/sudam, Rio Claro, 136pp.
- Pezzato, L.E.; Barros, M.M; Del Carratorre, C.R.; Salaro, A.L.; Oliveira, M.C.B.; Rosa, G.J.M. 2000. Avaliação do matrinxã (*Brycon cephalus*) mantidos sob condições de clima subtropical. In: Cyrino, J.E.P.; Moura, J.C.; Caseiro, A.C.; Sampaio, A.M.M. *Anais do VIII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, Piracicaba, São Paulo. SP417.
- Purzyc, L.; Calkosinski, I. 1998. Ecto ATPase from rat lymphocytes – in vivo studies on the influence of levamisole. *Polish Journal of Pharmacology*, 50: 239-251.
- Raa, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz-Suárez, L.E.; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, M.; Olvera-Novoa, M.A.; Cyvera-Cerecedo, R. (Eds). *Avances em Nutrición Acuícola V. Memórias del V Symposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Mérida, Yucatán, México. p. 19-22.

- Roubach, R.; Gomes, L.C.; Val, A.L. 2001. Safest level of tricaine methanosulfanate (MS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã. *Acta Amazonica*, 31: 159-163.
- Roubach, R.; Correia, E.S.; Zaiden, S.; Martino, R.C.; Cavalli, R.O. 2003. Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture*, 34: 28-35.
- Sahoo, P.K.; Mukherjee, S.C. 2002. The effect of immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 1-16.
- Sajid, M.S.; Iqbal, Z.; Muhammad, G; Iqbal, M.U. 2006. Immunomodulatory effect of various anti-parasitics: a review. *Parasitology*, 132: 301-313.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Secombes, C.J. 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 4: 421-436.
- Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(1-2): 15-24.
- Urbinati, E.C; Carneiro, P.C.F. 2001. Metabolic and hormonal responses of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under the influence of benzocaine. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 16(1): 75-85.
- Urbinati, E.C.; Carneiro, P.C.F. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Editora TechArt, São Paulo, São Paulo. p. 171-194.

- Urbinati, E.C; Abreu, J.S.; Camargo, A.C.S.; Landines, M.A. 2004. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture*, 299: 389-400.
- Val, A.L.; Honczaryk, A. 1995. *Criando peixes na Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 160pp.
- Volpatti, D.; D'angelo, L.; Jeney, G.; Jeney, Z.; Anderson, D.P.; Galeotti, M. 1998. Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3–4): 201–206.
- Wedemeyer, G.A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman & Hall, Nova York. 232pp.
- Wendelaar-Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 591-625.

OBJETIVO DO PRESENTE ESTUDO

Avaliar a eficácia do levamisol incorporado à dieta como imunoestimulante para a melhoria do desempenho zootécnico e como mitigador do estresse no transporte e no pós-transporte do matrinxã, *Brycon amazonicus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a dose letal (DL_{50} - dose letal para 50% da população) da bactéria *Aeromonas hydrophila* para matrinxã, com aplicabilidade para testes de desafios;
- b) Avaliar os efeitos do levamisol nas respostas fisiológicas e no crescimento do matrinxã antes e após infecção causada pela bactéria *A. hydrophila*, e;
- c) Testar a eficácia do levamisol como mitigador do estresse durante e após o transporte do matrinxã.

CAPÍTULO 2

Tolerância do matrinxã (*Brycon amazonicus*) a bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila*.

RESUMO

Para determinar a dose letal (DL₅₀ 96-h) da bactéria *Aeromonas hydrophila* para o matrinxã, *Brycon amazonicus*, com aplicabilidade para testes de desafio, foram utilizados 90 peixes (63,23 ± 6,39 g), divididos em cinco tratamentos, com diferentes soluções bacterianas: T₁ - Controle (solução salina 0,9% NaCl); T₂ (4 x 10¹¹ células/mL); T₃ (5 x 10¹¹ células/mL); T₄ (1,36 x 10¹² células/mL) e T₅ (3,06 x 10¹² células/mL). Os peixes foram previamente anestesiados com benzocaína (60 mg/L), inoculados na cavidade peritoneal com as suspensões bacterianas e distribuídos em 15 aquários de vidro de 80 L de capacidade, com aeração constante. O experimento teve duração de 96 h, no qual foi observada a mortalidade e a qualidade da água foi monitorada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três réplicas. A DL₅₀ 96-h foi estimada de acordo com o método Spearman-Kärber. Os parâmetros físico-químicos da água permaneceram dentro das condições consideradas adequadas para o desenvolvimento e saúde dos organismos aquáticos. A mortalidade dos peixes aumentou nas concentrações crescentes de *A. hydrophila* (T₁ = 0%; T₂ = 16,66%; T₃ = 44,44%; T₄ = 72,22% e T₅ = 100%). As primeiras mortalidades ocorreram em 57 h após a inoculação das concentrações bacterianas, sendo os primeiros sinais da ação bacteriana observados em 24 h após a inoculação. Os resultados sugerem que o matrinxã é mais tolerante a bactéria *A. hydrophila* quando comparado a outros peixes teleósteos, cujo valor da DL₅₀ 96-h foi 6,66 x 10¹¹ células/mL de solução salina.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, DL₅₀ 96-h, matrinxã

ABSTRACT

Tolerance of matrinxã (*Brycon amazonicus*) to the gram-negative bacteria *Aeromonas hydrophila*

In order to determine the lethal dose (96-h LD₅₀) of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*, to be applied in challenge tests, 90 fish (63.23 ± 6.39 g) were divided into five treatments, with different bacterial solutions: T₁ - Control (0.9% NaCl saline solution); T₂ (4 × 10¹¹ cells/mL); T₃ (5 × 10¹¹ cells/mL); T₄ (1.36 × 10¹² cells/mL) and T₅ (3,06 × 10¹² cells/mL). Fish were previously anesthetized with benzocaine (60 mg/L), inoculated in the peritoneal cavity with the bacterial suspensions and then distributed in fifteen 80-L test chambers equipped with air compressors. The experiment lasted for 96 hours, in which fish mortality was observed and water variables were monitored. The experiment was randomly designed in three replicates. The 96-h LD₅₀ was estimated according to the trimmed Spearman-Kärber method. Water quality variables remained within adequate ranges for fish health and performance. Fish mortality rate increased with the bacterial concentrations of *A. hydrophila* (T₁ = 0%; T₂ = 16.66%; T₃ = 44.44%; T₄ = 72.22% and T₅ = 100%). Fish mortality was first observed after 57 h of the bacterial inoculation, although, the signs of the bacterial infection were observed 24 h after the inoculation. The results suggest that matrinxã is more tolerant to *A. hydrophila* infection compared to other teleost fishes, which present lower 96-h LD₅₀ values than 6.66 × 10¹¹ cells/mL saline solution, found to matrinxã.

Key-words: *Aeromonas hydrophila*, 96-h LD₅₀, matrinxã, tropical fishes

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a demanda por produtos que possam prevenir doenças em peixes e melhorar sua resistência imunológica em condições de cultivo tem sido alternativa promissora para o aprimoramento de técnicas de manejo (Chen & Ainsworth, 1992; Siwicki et al., 1994; Sakai et al., 1996; Findlay & Munday, 2000; Sakai et al., 2001; Sahoo & Mukherjee, 2003; Rao & Chakrabarti, 2005; Chakrabarti & Rao, 2006). Para avaliar a eficiência e a segurança de novos produtos na piscicultura, são realizados testes de desafio, principalmente, utilizando bactérias patogênicas como agente estressor, devido a praticidade das técnicas e da qualidade dos resultados. Na literatura, são descritos inúmeros testes de desafio com bactérias por meio de injeções intraperitoneais, a fim de se avaliar a eficácia dos produtos testados em controlar as respostas do organismo ao agente infeccioso ou até mesmo em prevenir a mortalidade (Kim et al., 2001; Jain & Wu, 2003; Kodama et al., 2007; Rairakhwada et al., 2007; Sahu et al., 2007).

Conhecer os limites de tolerância de uma espécie a determinado agente estressor pode impedir seus efeitos adversos na saúde do animal (Wedemeyer, 1996). Esses limites podem variar de acordo com a espécie, a idade ou o tamanho, e com o tempo de exposição ao agente estressor.

As bactérias do gênero *Aeromonas* são comumente utilizadas para este fim, por apresentarem distribuição mundial e por serem responsáveis por perdas consideráveis na aquicultura. Estas bactérias são gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos (Roberts et al., 1996) e podem atingir qualquer espécie de peixe, sendo agente tipicamente oportunista. As espécies patogênicas para peixes de água doce são: *A. hydrophila*, *A. sóbria* e *A. caviae*. A espécie *A. salmonicida* é a única não-móvel do complexo *Aeromonas* (Griffin et al., 1953) e os isolados móveis mais virulentos desse gênero são os da *A. hydrophila* (Holliman, 1993).

A. hydrophila tem como habitat natural a matéria orgânica em decomposição na água, estando também presente na flora intestinal de peixes saudáveis. Comumente presente em sistemas de produção, as *Aeromonas* podem causar septicemia hemorrágica em peixes sob condições de estresse (Moraes & Martins, 2004). Isto ocorre, principalmente, em ambientes com temperatura de água elevada e com grande quantidade de material orgânico em associação com fatores estressantes, como alta densidade de estocagem, mudanças bruscas de temperatura, traumatismos decorrentes de manuseio inadequado, hipóxia, transporte, deficiências nutricionais, e infecções por fungos e parasitas, que contribuem para mudanças fisiológicas e aumento da suscetibilidade a infecção (Costa, 2004).

Utilizar estas bactérias como indicadoras da eficiência de produtos que possam minimizar o estresse num sistema intensivo de criação poderá contribuir para a melhoria da piscicultura na região amazônica. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar os limites de tolerância (DL₅₀ 96-h) da bactéria *A. hydrophila* para o matrinxã, visando possíveis aplicações em testes de desafio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Pós-larvas de matrinxã foram adquiridas de piscicultores locais e transferidas para a Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do INPA, onde foram mantidas em viveiros escavados de 150 m². Foram alimentadas com ração

extrusada com 40% de proteína bruta, moída e peneirada em peneiras com mesh de 1 mm, até atingirem peso médio aproximado de 60 gramas.

2.1 Origem das bactérias e preparo das suspensões bacterianas

Foi utilizada a cepa patogênica de *A. hydrophila* obtida no Centro de Aqüicultura da UNESP/CAUNESP (Jaboticabal/SP) e que vem sendo mantida no laboratório de Microbiologia da Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos (CPTA) do INPA. Para a preparação das diferentes concentrações das soluções bacterianas, inicialmente, a bactéria foi reativada em meio de cultura caldo nutritivo e incubada a 30 °C, durante 24 horas. Posteriormente, as bactérias reativadas foram semeadas em placas contendo Ágar Müeller-Hinton pela técnica de spread-plate e incubadas a 30 °C, durante 24 horas. Para o preparo das suspensões, foi feita uma solução concentrada das bactérias, usando solução salina estéril 0,9% NaCl, e, posteriormente, diluída até as concentrações previamente determinadas em experimento piloto. Em seguida, foi realizada a contagem das células bacterianas utilizando-se 10 µL da diluição na câmara de Neubauer e examinada em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Para calcular o número de células por mL foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células} = \frac{\text{Total de bactérias contadas} \times \text{Fator de diluição} \times 4 \times 10^8}{5 (\text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes}) \times 100 (\text{profundidade da câmara})}$$

Após a determinação do número de células bacterianas na suspensão concentrada, foram feitas quatro diluições: 4×10^{11} células/mL, 5×10^{11} células/mL, $1,36 \times 10^{12}$ células/mL e $3,06 \times 10^{12}$ células/mL, que foram inoculadas nos peixes.

2.2 Delineamento experimental

Para a determinação da DL₅₀, foram utilizados 90 peixes divididos em cinco tratamentos, com três réplicas cada: T₁ = Controle (solução salina 0,9%); T₂ = 4×10^{11} células/mL; T₃ = 5×10^{11} células/mL; T₄ = $1,36 \times 10^{12}$ células/mL e T₅ = $3,06 \times 10^{12}$ células/mL.

Antes do início do experimento, os peixes foram mantidos por 24 h em jejum para esvaziamento do trato gastrointestinal. Posteriormente, seis peixes ($63,23 \pm 6,39$ g) de cada concentração e suas réplicas foram previamente anestesiados com

benzocaína (60 mg/L) e inoculados na cavidade peritoneal com as suspensões bacterianas. Em seguida, estes foram transferidos para 15 aquários de vidro com capacidade para 80 L, em sistema semi-estático e aeração constante, por 96 horas. Durante esse período, foi observada a mortalidade dos peixes e monitorada a qualidade da água.

2.3 Monitoramento da qualidade de água

A qualidade da água de cada aquário experimental foi monitorada para evitar alterações que prejudicassem o desempenho do bioensaio. Este monitoramento foi realizado diariamente (9:00 h) durante todo o período experimental. Após a amostragem da água de cada aquário, eram feitas trocas de 1/3 da água para evitar que a deterioração da água influenciasse nos resultados.

Oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica foram determinados utilizando medidor multiparamétrico digital da marca YSI (Yellow Spring Instruments) modelo 85/10; e o pH medido com medidor de pH digital da marca YSI modelo 60/10. As concentrações de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) foram determinadas pelo método colorimétrico, segundo Verdouw et al. (1978), e as absorvâncias foram obtidas usando espectrofotômetro da marca Amersham Pharmacia Biotech, modelo Novaspec II. Os valores de amônia não ionizada foram calculados segundo Kubitza (2003). A determinação da concentração de nitrito (NO_2^-) na água foi feita pelo método colorimétrico de Boyd & Tucker (1992) e as absorvâncias foram lidas no espectrofotômetro descrito acima. A alcalinidade total e a dureza total foram determinadas por meio de titulação descrita por Boyd & Tucker (1992). A alcalinidade total foi determinada usando o indicador metil-laranja, titulando-se a amostra com solução de H_2SO_4 e a dureza total da água foi feita utilizando como indicador o eriocromo-negro. O gás carbônico foi feito segundo Boyd & Tucker (1992), porém, utilizando adaptação para o mínimo contato com o ar atmosférico. Para isso, foram utilizadas seringas de 10 mL, para a retirada das amostras sem contato com o ar. Foi utilizado como indicador a fenolfetaleína e como titulante, o carbonato de sódio.

2.4 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A DL_{50} 96-h foi estimada de acordo com o método Spearman-Kärber, segundo Hamilton et al.

(1977). Os resultados da qualidade da água foram comparados mediante a análise de variância (ANOVA). Quando os tratamentos apresentaram diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. Ambas as análises foram realizadas a 5% de probabilidade, utilizando o software Statistica 6.0.

3 RESULTADOS

3.1 Qualidade da água

Durante todo o período experimental, os parâmetros físico-químicos da água, tais como oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, pH, alcalinidade, dureza e CO₂, não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 1). Entretanto, as concentrações de amônia e de nitrito sofreram variações diárias entre os diferentes tratamentos, sendo os maiores valores observados nos tratamentos com peixes infectados com maior concentração da bactéria.

3.2 Mortalidade dos peixes e dose letal (DL₅₀) de *A. hydrophila* para o matrinxã

Durante o período de 96 h de experimento, não houve mortalidade de peixes no TR1 (controle – solução salina a 0,9%). Entretanto, aumento crescente na mortalidade dos peixes foi observado com o aumento das concentrações das soluções bacterianas (Tabela 2).

As primeiras mortalidades ocorreram após 57 h da inoculação bacteriana. Entretanto, os primeiros sinais da ação bacteriana, como erosão nas nadadeiras, principalmente na caudal e na dorsal, e perda de escamas, foram observados 24 h após a inoculação (Figura 1). Como podem ser observadas nas Figuras 2 e 3, em seqüência, ocorreram lesões ulcerativas no olho (Figura 2), depois no abdômen e poro urogenital (Figura 3). Sinais clínicos que também antecederam a morte dos animais infectados foram perda de equilíbrio e movimentos respiratórios mais lentos. Também foram observados exoftalmia e a presença de excesso de muco na região da cabeça (Figura 4).

Utilizando os dados de mortalidade dos peixes de cada tratamento, durante as 96 h de experimento, a DL₅₀ foi estimada pelo método de Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). De acordo com os dados obtidos, a dose letal de *A.*

hydrophila para a mortalidade de 50% da população de matrinxã em 96 h foi $6,66 \times 10^{11}$ células/mL de solução salina.

4 DISCUSSÃO

4.1 Qualidade da água

Os peixes sofrem influência direta do ambiente onde vivem. Qualquer alteração nos parâmetros físicos e químicos da água pode causar sérios prejuízos aos animais, quando seus limites de tolerância se excedem (Boyd, 1990; Wedemeyer, 1996; Baldisserotto e Silva, 2004).

Em ensaios laboratoriais, é comum o acompanhamento da qualidade da água dos tanques experimentais, pois a variação em um dos parâmetros físico-químicos pode interferir nos resultados (Andrade et al., 2006; Affonso et al., 2007). Esse controle deve ser ainda mais criterioso quando da realização de testes de tolerância de uma espécie a um agente estressor, pois estes devem oferecer resultados confiáveis, que traduzam, realmente, os limites toleráveis pelo animal (Lima, 2003; Avilez et al., 2004; Cavero et al., 2004).

No presente estudo, oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade, pH, alcalinidade, dureza e gás carbônico não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tratamentos durante todo o período experimental. De acordo com as recomendações de Kubitzka (2003), os valores obtidos para esses parâmetros estão dentro dos limites considerados adequados para o desenvolvimento e saúde dos organismos aquáticos.

A amônia na água é um dos principais compostos que pode causar prejuízo à saúde dos peixes. Esse composto pode ser encontrado na forma de íon amônio (NH_4^+) ou amônia (NH_3), sendo o pH o principal fator que determina a proporção dessas duas formas na água; quanto maior o pH, maior será a porcentagem de amônia tóxica (NH_3). A tolerância à amônia varia entre as diferentes espécies de peixes, sendo algumas mais sensíveis, como os salmonídeos, e outras mais resistentes, como o bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (Carneiro e Urbinati, 2001).

Embora não seja descrito na literatura a concentração letal de amônia não ionizada para matrinxã, Carneiro e Urbinati (2001) sugerem que esta espécie pode tolerar até 0,7 mg NH_3/L por 24 h. No presente estudo, apesar das concentrações de amônia total e tóxica aumentarem proporcionalmente com as concentrações da

bactéria (Tabela 1), estas permaneceram abaixo dos limites tolerados por peixes tropicais (Kubtiza, 2003) e daquela descrita por Carneiro e Urbinati (2001) para esta espécie. Portanto, a mortalidade dos matrinxãs infectados por *A. hydrophila* não foi influenciada pelo aumento na concentração de amônia na água. Pelas observações feitas durante o teste de tolerância, é possível que a grande produção e liberação de muco por esses animais, a senescência das bactérias liberadas na água pelos peixes e o aumento da taxa metabólica dos peixes tenham influência sobre o aumento da concentração de amônia na água. O muco dos peixes é composto por diversas proteínas, proteases e peptídeos, entre outras substâncias (Watts et al., 2001; Magnadóttir, 2006; Molle et al., 2007) que, liberadas na água são decompostas por processos microbiológicos, liberando a amônia, podendo ter contribuído para os elevados níveis encontrados.

Outro parâmetro importante na avaliação da qualidade da água é o nitrito (NO_2^-). Esse composto, em altas concentrações, pode afetar a saúde dos peixes, pois, ao combinar-se com a hemoglobina, forma metahemoglobina, resultando em hipóxia tecidual (Knudsen & Jensen, 1997). Segundo Avilez et al. (2004), o matrinxã é muito sensível ao nitrito, cujo valor da DL_{50} 96-h é $0,86 \pm 0,05$ mg/L. As concentrações de nitrito obtidas neste estudo estiveram sempre abaixo dos níveis tóxicos para o matrinxã, não influenciando, portanto, no resultado do trabalho.

4.2 Dose letal (DL_{50}) de *A. hydrophila* para o matrinxã

Bactérias do gênero *Aeromonas* podem atacar as brânquias, o tegumento e o intestino de peixes. Segundo Pavanelli et al. (2002), tais bactérias são capazes de provocar a ruptura de pequenos vasos sangüíneos, implicando em lesões ulcerativas no tegumento, com aspecto hemorrágico, causando coloração avermelhada no corpo dos peixes. Neste estudo, além das lesões ulcerativas distribuídas pelo corpo dos animais, foram observadas também exoftalmia e a presença de excesso de muco na região da cabeça. Pavanelli et al. (2002) descreveram essas manifestações como sinais clínicos de infecção por *A. hydrophila* e, de acordo com Costa (2004), a grande proliferação da bactéria no intestino dos animais pode causar a liberação excessiva de catarro mucoso.

Schlotfeldt & Alderman (1995) observaram que a infestação por *A. hydrophila* em peixes, além dos sinais clínicos como os descritos para matrinxã neste estudo, pode causar também hemorragia necrótica de órgãos internos, principalmente rim e

fígado, e deposição de fluido sanguinolento na cavidade abdominal. Barja & Esteves (1988) observaram hemorragias nas brânquias, ao redor do ânus e nos órgãos internos, como fígado, baço e rim. Boijink & Brandão (2001) não observaram hemorragias aparentes nas brânquias e nos outros órgãos em jundiá (*Rhamdia quelen*), mas verificaram lesões ao redor do ânus e poro genital.

O efeito da bactéria *A. hydrophila* sobre os peixes pode variar de acordo com a resistência dos mesmos à infecção (Schlotfeldt & Alderman, 1995). Santos et al. (1991), determinaram, durante sete dias, a DL₅₀ da *A. hydrophila* para diferentes espécies de peixe: *Salmo trutta* (2×10^5 células/mL), *Anguilla japonica* ($>10^8$ células/mL), *Plecoglossus altivelis* ($8,6 \times 10^4$ células/mL), *Lepomis macrochirus* ($>10^8$ células/mL). Segundo esses autores, a toxicidade da bactéria pode variar dependendo da cepa bacteriana, cujos valores da DL₅₀ para *Onchorhynchus mykiss* variou entre $3,2 \times 10^4$ a $3,2 \times 10^8$ células/mL. Boijink & Brandão (2001) encontraram doses letais de *A. hydrophila* para o jundiá (*Rhamdia quelen*) de $1,3 \times 10^9$ e $3,5 \times 10^8$ UFC/mL, quando inoculadas intramuscularmente.

Andrade et al. (2006) encontraram valores da DL₅₀ de *A. hydrophila* para exemplares de matrinxã com peso médio de 55 g de $4,6 \times 10^{11}$ células/mL. Esses valores, inferiores aos encontrados neste experimento, sugerem que a dose letal também pode variar de acordo com o tamanho dos animais.

Comparando os resultados deste estudo com aqueles obtidos para as espécies descritas acima, é possível sugerir que o matrinxã apresenta alta tolerância a bactéria *A. hydrophila*, sendo a concentração letal para 50% da população, em 96 horas, de $6,66 \times 10^{11}$ células/mL de solução salina.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água durante as 96 horas de experimento para determinação da DL₅₀ da *A. hydrophila* para *B. amazonicus*. Valores expressos em Média ± DP. T₁ = Controle (solução salina 0,9%); T₂ = 4 x 10¹¹ células/mL; T₃ = 5 x 10¹¹ células/mL; T₄ = 1,36 x 10¹² células/mL e T₅ = 3,06 x 10¹² células/mL.

Parâmetros	Tratamentos				
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
Oxigênio (mg/L)	5,73±0,20 ^a	5,86±0,11 ^a	5,83±0,13 ^a	5,69±0,22 ^a	5,75±0,17 ^a
Temperatura (°C)	26,17±,24 ^a	26,23±0,20 ^a	26,23±0,23 ^a	26,25±0,19 ^a	26,22±0,22 ^a
Condutividade (µS/cm ³)	27,92±2,93 ^a	28,86±4,52 ^a	29,31±6,19 ^a	29,45±6,88 ^a	28,64±4,18 ^a
pH	7,13±0,14 ^a	7,10±0,18 ^a	7,05±0,22 ^a	7,11±0,14 ^a	7,08±0,16 ^a
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	13,47±0,9 ^a	14,18±1,7 ^a	14,73±1,8 ^a	15,16±2,2 ^a	13,56±1,5 ^a
Dureza (mg CaCO ₃ /L)	20,02±3,1 ^a	19,46±1,5 ^a	20,58±2,6 ^a	21,13±3,7 ^a	19,32±1,9 ^a
CO₂ (mg/L)	11,17±2,79 ^a	11,04±3,61 ^a	10,83±3,54 ^a	10,33±3,19 ^a	11,10±2,9 ^a
Amônia total (mg/L)	1,37±0,44 ^b	1,84±0,53 ^{ab}	2,09±0,65 ^{ab}	2,46±0,72 ^a	2,50±0,68 ^a
Amônia tóxica (mg/L)	0,008±0,000 ^b	0,011±0,000 ^b	0,012±0,000 ^a	0,014±0,000 ^a	0,016±0,000 ^a
Nitrito (mg/L)	0,005±0,000 ^b	0,005±0,000 ^b	0,006±0,000 ^b	0,011±0,000 ^a	0,011±0,000 ^a

Letras iguais na mesma linha indicam igualdade estatística (p>0,05).

Tabela 2. Mortalidade do matrinxã, *B. amazonicus*, após 96 h de inoculação peritoneal de diferentes concentrações de *A. hydrophila*. T₁ = Controle (solução salina 0,9%); T₂ = 4 x 10¹¹ células/mL; T₃ = 5 x 10¹¹ células/mL; T₄ = 1,36 x 10¹² células/mL e T₅ = 3,06 x 10¹² células/mL.

Tratamento	Nº peixes inicial	Nº peixes final	Mortalidade (%)
T ₁	18	18	0
T ₂	18	15	16,66
T ₃	18	10	44,44
T ₄	18	5	72,22
T ₅	18	0	100



Figura 1. Erosão das nadadeiras e perda de escamas no *B. amazonicus* causadas pela infecção por *A. hydrophila*.



Figura 2. Lesão ulcerativa no olho de *B. amazonicus* causada por *A. hydrophila*.



Figura 3. Lesões ulcerativas no abdômen e poro urogenital de *B. amazonicus* causadas por *A. Hydrophila*.



Figura 4. Exoftalmia e excesso de muco na região da cabeça de *B. amazonicus* causados por *A. hydrophila*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Affonso, E.G.; Silva, E.C.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Carvalho, C.S.M.; Nunus, E.S.S.; Ituassu, D.R.; Roubach, R.; Ono, E.A.; Fim, J.D.I.; Marcon, J.L. 2007. Effect of high levels of vitamim C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 147: 383-388.
- Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Brasil, E.M.; Matsuura, T.; Souza, R.T.Y.B.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Fernandes, E.B.; Affonso, E.G. 2006. Lethal dose (LD₅₀) of *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. Abstracts of the 41th Congress of the Brazilian Physiological Society, Ribeirão Preto, SP, p 209.
- Avilez, I.M.; Aguiar, L.H.; Altran, A.E.; Moraes, G. 2004. Acute toxicity of nitrite to matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1969), (Teleostei-Characidae). *Ciência Rural*, 34(6):1753-1756.
- Baldisserotto, B.; Silva, L.V.F. 2004. Qualidade da água. In: Baldisserotto, B.; Radunz Neto, J. (Eds). *Criação de jundiá*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. p.73-92.
- Barja, J.L.; Esteves, A.T. 1998. *Patologia en Acuicultura*. Enfermidades bacterianas. Caicyt, Espanha. 550pp.
- Boijink, C.L.; Brandão, D.A. 2001. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural*, 3(3):503-507.
- Boyd, C.C. 1990. *Water quality in ponds for aquaculture*. Birmingham Publishing, Londres. 482 pp.
- Boyd, E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn University, Auburn, Alabama.

- Cavero, B.A.S.; Pereira-Filho, M.; Bordinhon, A.M.; Fonseca, F.A.L.; Ituassú, D.R.; Roubach, R.; Ono, E.A. 2004. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(5): 513-516.
- Carneiro, P.C.F.; Urbinati, E.C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquaculture Research*, 32: 297-304.
- Chakrabarti, R.; Rao, Y.V. 2006. *Achyranthes aspera* stimulates the immunity and enhances the antigen clearance in *Catla catla*. *International Immunopharmacology*, 6: 782-790.
- Chen, D.; Ainsworth, A.J. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Journal of Fish Diseases*, 15: 295-304.
- Costa, A.B. 2004. Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Editora TechArt, São Paulo, 532pp.
- Findlay, V.L.; Munday, B.L. 2000. The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 23: 369-378.
- Griffin, P.J.; Sniezsko, S.F.; Friddle, S.B. 1953. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 82:129-138.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. 1977. Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, 11(7): 714-719. Correction 12(4): 417.

- Holliman, A. 1993. The veterinary approach to trout. *In: Brown, L. (Ed). Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. Pergamon Press, Oxford, England. p. 223-247.
- Jain, J.; Wu, Z. 2003. Effect of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture*, 218, 1–9.
- Kim, K.M.; Chun, S.B.; Koo, M.S.; Choi, W.J.; Kim, T.W.; Kwon, Y.G.; Chung, H.T.; Billiar, T.R.; Kim, Y.M. 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 747–756.
- Knudsen, P.K.; Jensen, F.B. 1997. Recovery from nitrite-induced methaemoglobinaemia and potassium balance disturbances in carp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16:1-10.
- Kodama, H.; Denso, A.; Nakagawa, T. 2007. Protection against atypical *Aeromonas salmonicida* infection in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of humus extract. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(4): 405-408.
- Kubitza, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. F. Kubitza, Jundiaí, SP. 229pp.
- Lima, R.L. 2003. *Inclusão do sal na ração e a toxicidade do nitrito em alevinos de jundiá (Rhamdia quelen)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. 60pp.
- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (Overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2): 137-151.

- Molle, V.; Campagna, S.; Bessin, Y.; Ebran, N.; Saint, N.; Molle, G. 2007. First evidence of the pore-forming properties of a keratin from skin mucus of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochemical Journal Immediate Publication*. 1-25.
- Moraes, F.R.; Martins, M.L. 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Editora TechArt, São Paulo, 532pp.
- Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M. 2002. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. 305pp.
- Rairakhwada, D.; Pal, A.K.; Bhatena, Z.P.; Sahu, N.P.; Jha, A.; Mukherjee, S.C. 2007. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 477-486.
- Rao, Y.V.; Chakrabarti, R. 2005. Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feed ingredients. *Fish and Shellfish Immunology*, 18: 327-334.
- Roberts, T.A.; Baird-Parker, A.C.; Tompkin, R.B. 1996. *Aeromonas*. In: *Microorganisms in Foods. Characteristics of Microbial Pathogens*. Blakie Academic and Professional, London. p. 5-19.
- Sahoo, P.K.; Mukherjee, S.C. 2003. Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 26: 65-76.

- Sahu, S.; Das, B.K.; Mishra, B.K.; Pradhan, J.; Sarangi, N. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 80-86.
- Sakai, M.; Kobayashi, M.; Kawauchi, H. 1996. In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. *Journal of Endocrinology*, 151: 113-118.
- Sakai, M.; Taniguchi, K.; Mamoto, K.; Ogawa, H.; Tabata, M. 2001. Immunostimulant effect of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, 24:433-438.
- Santos, Y.; Bandín, I.; Nieto, T.P. 1991. Cell-surface-associated properties of fish pathogenic bacteria. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3:297-301.
- Schlotfeldt, H.J.; Alderman, D.J.A. 1995. Practical guide for the fresh water fish farmer. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 15(4): 134-157.
- Siwicki, A.K.; Anderson, D.P.; Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41: 125-39.
- Verdouw, H.; Van Eched, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*, 12(6): 397-402.
- Watts, M.; Munday, B.B.; Burke, C.M. 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*, 79(8): 570-574.
- Wedemeyer, G. A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman & Hall, Nova York. 232pp.

CAPÍTULO 3

Efeito da suplementação de levamisol nas respostas fisiológicas e no desempenho do matrinxã, *Brycon amazonicus*

RESUMO

O efeito da adição de diferentes concentrações de levamisol (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/kg) no desempenho e nos parâmetros fisiológicos de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, foram avaliados pelo período de 45 dias e após desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*. A ingestão de levamisol não influenciou o consumo de ração, o ganho de peso e a sobrevivência do matrinxã, mas causou aumento significativo no número de eritrócitos (RBC), leucócitos e trombócitos, e nos níveis de proteínas totais (Pt). Após o desafio, a alimentação com levamisol não minimizou as respostas fisiológicas causadas pela infecção bacteriana, evidenciada pela redução nos níveis de Pt e número de eritrócitos e que foi compensada pelo aumento da concentração de hemoglobina total e celular. O aumento nos níveis de trombócitos após a infecção corrobora com pesquisas que relatam estas células com função de defesa em peixes.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, imunoestimulante, levamisol, matrinxã.

ABSTRACT

Effect of dietary levamisole on performance and physiological responses of matrinxã, *Brycon amazonicus*

Juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) were fed different levamisole doses (0, 100, 200, 300, 400 and 500 mg/kg of diet), during 45 days, and then challenged with *Aeromonas hydrophila*, in order to evaluate its effect on fish physiological profile and performance. Levamisole ingestion had no influence on feed intake, weight gain and survival of matrinxã, but it caused a significant increase in blood erythrocytes (RBC), leucocytes and thrombocytes number, as well as, in the total protein levels. After the bacterial challenge, dietary levamisole did not mitigate the physiological responses caused by the bacterial infection, such as the decrease in the Pt levels and RBC number, which was compensated with an increase in total and cellular hemoglobin concentration. The increase in thrombocytes number after infection corroborates with researches which relate its function as a cell of the fish immune system.

Key-words: levamisole, immunostimulant, *Aeromonas hydrophila*, *Brycon amazonicus*.

1 INTRODUÇÃO

Durante as duas últimas décadas, o uso de imunostimulantes na aquicultura vem se tornando comum, principalmente, devido a sua atuação no sistema imune, prevenindo doenças em peixes (Jeney et al., 1997; Montero et al., 1999; Findlay & Munday, 2000; Bricknell & Dalmo, 2005; Li et al., 2006a; Magnadóttir, 2006; Kumari & Sahoo, 2006). Além disso, estas substâncias, ao tornarem os animais mais saudáveis, minimizam os efeitos indesejáveis do estresse (Anderson, 1992; Jeney et al., 1997; Volpatti et al., 1998).

Dentre os inúmeros imunostimulantes estudados em peixes, o levamisol tem apresentado diversas vantagens que favorecem sua aplicação, destacando-se a melhora da função do sistema imune não específico (Mulero et al., 1998; Cuesta et al., 2002; Kumari & Sahoo, 2006), resistência dos peixes contra diversas bactérias patogênicas (Sahoo e Mukherjee, 2002; Munday & Zilberg, 2003; Gopalakannan & Arul, 2006), e contra parasitas (Geets et al., 1992), e ainda a contribuição para o crescimento de algumas espécies de peixes (Mulero et al., 1998; Gopalakannan & Arul, 2006; Li et al., 2006b).

Para a administração do levamisol, dois fatores importantes devem ser considerados: as concentrações e o tempo de administração da dieta. Altas doses de levamisol podem suprimir as respostas imunes, ou apresentar efeitos negativos,

e baixas doses podem não ser eficientes (Anderson et al., 1989; Siwicki et al., 1990). Da mesma maneira, a administração por períodos muito curtos pode não surtir efeito sobre o sistema imune do animal, assim como a exposição contínua pode induzir à tolerância, ou até mesmo à supressão da resposta imune (Bricknell & Dalmo, 2005).

Para espécies nativas da região amazônica de interesse para a piscicultura, a suplementação de imunostimulantes na ração, como a vitamina C, tem mostrado resultados positivos, principalmente, quanto ao aumento da resistência imunológica e crescimento dos peixes (Chagas et al., 2005; Menezes et al., 2006; Affonso et al., 2007; Andrade et al., 2007). O matrinxã, *Brycon amazonicus*, é uma das espécies nativas da região amazônica (Lima, 2003) de grande valor econômico (Roubach et al., 2003). Esta espécie, embora bem adaptada ao cativeiro, é muito sensível a práticas de manejo comuns na piscicultura, como o manuseio e transporte, podendo apresentar alta mortalidade. Dessa forma, essa pesquisa foi conduzida com os objetivos de: 1) avaliar a eficiência da suplementação de diferentes doses de levamisol na dieta do matrinxã, em condições laboratoriais, e de 2) avaliar se o levamisol é capaz de minimizar as respostas de estresse do matrinxã causadas pelo desafio com *Aeromonas hydrophila*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Pós-larvas de matrinxã foram adquiridas de piscicultores locais e transferidas para a Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ) do INPA. Na CPAQ, os peixes foram mantidos em viveiros escavados de 150 m², e alimentados com ração comercial extrusada contendo 40% de proteína bruta, moída e peneirada em peneiras com mesh de 1 mm, até atingirem peso médio de 25 gramas.

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em duas etapas, como descrito a seguir:

2.1.1 Avaliação da eficiência da suplementação de diferentes doses de levamisol na ração de matrinxã em condições experimentais.

Após o período de aclimatação, 720 peixes foram uniformizados por tamanho utilizando-se um classificador de barras. Em seguida, foram pesados ($27,0 \pm 0,98$ g) e distribuídos em seis grupos de 120 peixes (40 por réplica) em tanques de PVC de

500 litros, abastecidos, individualmente, com água de poço semi-artesiano e com sistema de aeração contínua.

O delineamento experimental consistiu em seis tratamentos: Controle – somente ração peletizada com 36% de proteína bruta e sem adição de levamisol; L100, L200, L300, L400 e L500 com suplementação de 100, 200, 300, 400 e 500 mg de cloridrato de levamisol/kg de ração, respectivamente. Cada tratamento foi constituído por três réplicas, totalizando 18 unidades experimentais. Durante 45 dias, os peixes foram alimentados com a ração experimental (item 2.2), no período da manhã (9:00 h) e da tarde (17:00 h), até a saciedade aparente. Ao final dos 45 dias de alimentação, foi feita a biometria de todos os peixes e a coleta de sangue de seis peixes por réplica, destinadas à análises (item 2.3). Durante todo o experimento, os peixes foram avaliados quanto ao desempenho frente às diferentes concentrações de levamisol (item 2.5).

2.1.2 Avaliação do efeito de diferentes concentrações de levamisol na ração do matrinxã após infecção com *A. hydrophila*

Todo o procedimento para o preparo das soluções bacterianas está descrito em detalhes no Capítulo 2, sendo, portanto, citado resumidamente neste capítulo.

Utilizando-se uma cepa patogênica de *A. hydrophila*, foi preparada uma suspensão concentrada da bactéria, cujo número de células foi determinado em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 400 vezes, segundo Koch (1994).

Baseado no resultado da DL₅₀ 96-h de *A. hydrophila* ($6,66 \times 10^{11}$ células/mL) para matrinxã, descrito no Capítulo 2, foi utilizado para o teste de desafio 60% desta concentração ($3,96 \times 10^{11}$ células/mL), inoculada dentro da cavidade peritoneal dos peixes previamente alimentados com rações suplementadas com diferentes doses de levamisol durante 45 dias (item 2.1.1). Após sete e 14 dias da inoculação, foram coletadas amostras de sangue de seis exemplares por réplica para análises sangüíneas (item 2.3) e realizada a biometria de todos os animais. Durante todo o período experimental, foi observada a mortalidade dos peixes.

2.2 Preparo da ração suplementada com levamisol

A suplementação do levamisol foi feita em ração comercial contendo 36% de proteína bruta. Essa foi triturada, usando moinho martelo com peneira de 1 mm de

mesh, e acrescentado levamisol nas quantidades 100, 200, 300, 400 e 500 mg de levamisol/kg de ração. Em seguida, a mistura foi umedecida com 350 mL de água/kg, sendo a massa peletizada utilizando-se um picador de carne (Marca CAF, modelo 22S). Os peletes foram secos em estufa a 40 °C, resfriados, embalados e armazenados a -20 °C. Para o tratamento controle, a mesma ração comercial foi peletizada sem a suplementação de levamisol.

2.3 Coleta e análises de sangue

Amostras de sangue de exemplares de matrinxã foram coletadas após 45 dias de alimentação com diferentes doses de levamisol (pré-desafio) e em sete e 14 dias após infecção com a bactéria *A. hydrophila*.

Antes da coleta de sangue, os peixes foram anestesiados com benzocaína a 10% por aproximadamente 2 minutos. Em seguida, o sangue foi coletado por punção da veia caudal de seis peixes por réplica, utilizando seringas com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) a 10%. As amostras foram destinadas às determinações dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos descritos a seguir:

- ***Contagem de eritrócitos e leucócitos totais***

A contagem de eritrócitos (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer após diluição em solução de Natt & Herrick (1952). Após 10 minutos de repouso, a contagem dos eritrócitos foi feita na câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico com ampliação de 400 vezes. Os eritrócitos foram contados em cinco áreas de 0,04 mm² e os valores expressos em cél/ μ Lx10⁶. A contagem dos leucócitos totais (WBC) foi feita utilizando-se as extensões sangüíneas segundo Tavares-Dias et al. (2002), após serem previamente coradas pelo método de coloração rápida May Grünwald-Giemsa Wright (MGGW) segundo Tavares-Dias & Moraes (2003).

- ***Determinação do Hematócrito (Ht)***

O Ht foi determinado com uso de tubo capilar heparinizado e centrifugado em centrífuga de microhematócrito (marca FANEM, modelo 241) a 5000 rpm durante

seis minutos. A leitura do percentual (%) da sedimentação dos eritrócitos foi feita em uma escala padronizada de volume celular.

- ***Determinação da concentração de hemoglobina [Hb]***

Para dosagem da [Hb] foi utilizado o método da cianometahemoglobina. O procedimento consiste na diluição de 10 µl de sangue em 2 mL do reagente de Drabkin, que, após homogeneização, permanece em repouso por 3 minutos. A amostra foi lida em absorbância de 540 nm em espectrofotômetro (marca Amersham Pharmacia Biotech, modelo Novaspec II). A concentração de hemoglobina foi calculada usando-se as fórmulas:

$$\text{Fator} = 14,3/\text{Absorbância padrão}$$

$$\text{Hb (g/dL)} = \text{Absorbância da amostra} \times \text{Fator}$$

- ***Índices hematimétricos de Wintrobe***

Após obtenção dos resultados de RBC, Ht e [Hb], para cada indivíduo, os valores do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados seguindo as recomendações de Wintrobe (1934), como descrito a seguir:

$$\text{VCM } (\mu\text{m}^3/\text{cel}) = \text{Ht} \times 10 / \text{RBC}$$

$$\text{CHCM } (\%) = [\text{Hb}] \times 100 / \text{Ht}$$

- ***Determinação da glicose plasmática***

A determinação da glicose foi feita pelo método enzimático-colorimétrico (glicose oxidase), utilizando-se kit comercial (marca Doles). As amostras de sangue foram centrifugadas numa centrífuga (marca Eppendorff) para a separação do plasma dos eritrócitos. Em seguida, 10 µl de plasma de cada amostra foi diluído em 1 mL do reagente Glucox, posteriormente agitado em agitador de tubo (marca FANEM, modelo 251) e mantido em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. As amostras foram lidas em 510 nm em espectrofotômetro. A glicose plasmática foi calculada usando-se as fórmulas:

$$\text{Fator} = 100/\text{Absorbância padrão}$$

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \text{Absorbância da amostra} \times \text{Fator}$$

- **Determinação da proteína total**

A determinação da proteína total foi feita pelo método de biureto, utilizando um kit comercial (marca Doles). Após a centrifugação do sangue, 20 µl de plasma de cada amostra foi diluído em 1 mL da solução de biureto e 1 gota de NaOH 6M, posteriormente agitado num agitador de tubo (marca FANEM, modelo 251). Após repouso de cinco minutos, as amostras foram lidas em 550 nm em espectrofotômetro. A proteína total foi calculada usando-se a fórmula:

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = \frac{(\text{Absorbância da amostra} \times 4)}{\text{Absorbância da média dos padrões}}$$

2.4 Monitoramento da qualidade da água

Diariamente (9:00 h) e durante todo o período experimental foram feitas análises físico-químicas da água. O oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica foram determinados utilizando medidor multiparamétrico digital da marca YSI, modelo 85/10; e o pH medido com medidor de pH digital da marca YSI, modelo 60/10. As concentrações de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) e de nitrito (NO_2^-) foram determinadas pelo método colorimétrico, segundo Verdouw (1978) e Boyd & Tucker (1992), respectivamente. A alcalinidade total, dureza total e gás carbônico foram determinados por titulação conforme descrito por Boyd & Tucker (1992).

2.5 Parâmetros zootécnicos

Para avaliação do desempenho dos peixes alimentados com ração suplementada com diferentes concentrações de levamisol (item 2.1.1), foram determinados os seguintes parâmetros zootécnicos:

Ganho de peso médio individual: $\text{GPMI} = (\text{peso médio final} - \text{peso médio inicial})$, expresso em gramas;

Ganho de peso médio individual diário: $\text{GPD} = (\text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}) / \text{tempo}$, expresso em gramas por dia;

Taxa de crescimento específico: $\text{TCE} = [100 (\ln \text{Peso final} - \ln \text{Peso inicial}) / \text{tempo}]$; expresso em %/dia;

Conversão alimentar aparente: $\text{CA} = \text{consumo de alimento (g)} / \text{ganho em peso (g)}$;

Consumo médio de ração individual: $\text{CMRI} = \text{Consumo de ração total} / \text{número de peixes}$; expresso em gramas;

Consumo diário de ração: $CD = \text{Consumo no período} / [(\text{peso final} + \text{peso inicial})/2] / \text{dias} \times 100$, expresso em %PV/dia;

Sobrevivência: S = percentagem de sobreviventes em relação ao número inicial de peixes em cada tratamento.

2.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados foram testados para normalidade e resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e para homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Os resultados dos tratamentos do item 2.2.1, dos parâmetros zootécnicos e da análise de água foram determinados mediante a análise de variância (ANOVA), pelo teste F. Para avaliação do efeito da inoculação da bactéria sobre os parâmetros fisiológicos do matrinxã, foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo, na qual os tempos de coleta considerados foram: pré-desafio (animais alimentados com rações suplementadas com doses de levamisol durante 45 dias) e sete e 14 dias após desafio. Os tratamentos que apresentaram diferenças significativas tiveram as médias comparadas pelo Teste de Tukey. Ambas as análises foram realizadas a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando o software Statsoft Statistica versão 6.0.

3 RESULTADOS

3.1 Qualidade da água

Durante o período experimental os parâmetros físico-químicos da água não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$) entre os tratamentos, permanecendo dentro das condições adequadas para o cultivo de organismos aquáticos (Tabela 1) (Arana, 1997; Kubitzka, 2003).

Tabela 1. Qualidade da água dos tanques durante o experimento com juvenis de matrinxãs alimentados com rações suplementadas com diferentes doses de levamisol por 45 dias. Controle; L100; L200; L300; L400 e L500 com 0, 100, 200, 300, 400, e 500 mg levamisol/kg ração, respectivamente.

Parâmetros	Tratamentos					
	Controle	L100	L200	L300	L400	L500
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,08±0,19	5,06±0,07	5,12±0,28	5,16±0,14	5,15±0,12	5,08±0,21
Temperatura (°C)	27,24±0,05	27,19±0,03	27,18±0,06	27,11±0,05	27,16±0,01	27,20±0,01
Condutividade (µS/cm ³)	19,36±0,39	20,01±0,69	19,54±0,89	19,19±0,11	19,32±0,80	19,29±0,76
pH	5,37±0,08	5,43±0,08	5,44±0,06	5,53±0,09	5,51±0,02	5,48±0,02
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ /L)	73,7±0,58	72,2±2,56	66,5±2,12	71,0±2,00	67,3±5,96	66,5±5,67
Dureza total (mg CaCO ₃ /L)	18,32±2,88	18,35±5,77	18,35±2,88	16,68±2,88	20,02±5,00	16,67±2,88
CO₂ (mg/L)	15,5±2,5	16,7±2,8	13,3±1,44	12,7±1,44	13,3±1,44	14,2±1,44
NH₃+NH₄⁺ (mg/L)	0,268±0,11	0,295±0,12	0,215±0,04	0,238±0,04	0,205±0,05	0,292±0,18
NO₂⁻ (mg/L)	0,004±0,001	0,004±0,000	0,004±0,001	0,002±0,001	0,003±0,000	0,003±0,000

Valores expressos em média ± desvio padrão.

3.2 Efeito da suplementação de diferentes concentrações de levamisol na dieta do matrinxã

Em condição de bioensaio, a suplementação com diferentes concentrações de levamisol não influenciou significativamente ($P>0,05$) no consumo de ração, no ganho de peso e na sobrevivência do matrinxã (Figuras 1 - 3). Os animais apresentaram ganho de peso médio de $38,3 \pm 8,4$ g, peso médio final de $65,8 \pm 9,3$ g e conversão alimentar média de $1,36 \pm 0,11$. Os resultados indicam, entretanto, tendência ao menor consumo de ração e, conseqüentemente, menor ganho de peso nos animais alimentados com altas doses do levamisol (500 mg/kg).

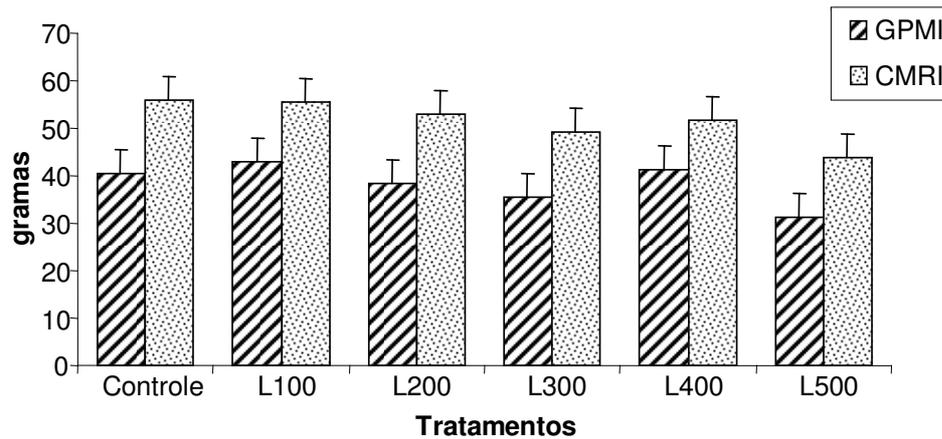


Figura 1. Ganho de peso médio individual (GPMI) e consumo médio de ração individual (CMRI) de matrinxãs alimentados com rações suplementadas com diferentes doses de levamisol durante 45 dias. Controle; L100; L200; L300; L400 e L500 com 0, 100, 200, 300, 400, e 500 mg levamisol/kg ração, respectivamente. Média \pm desvio padrão.

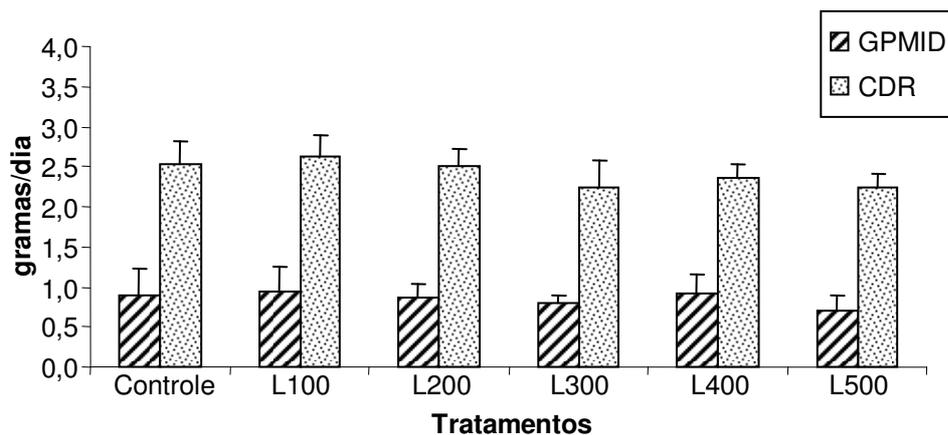


Figura 2. Ganho de peso médio individual diário (GPMID) e consumo diário de ração (CDR) de matrinxãs alimentados com rações suplementadas com diferentes doses de levamisol durante 45 dias. Controle; L100; L200; L300; L400 e L500 com 0, 100, 200, 300, 400, e 500 mg levamisol/kg ração, respectivamente. Média \pm desvio padrão.

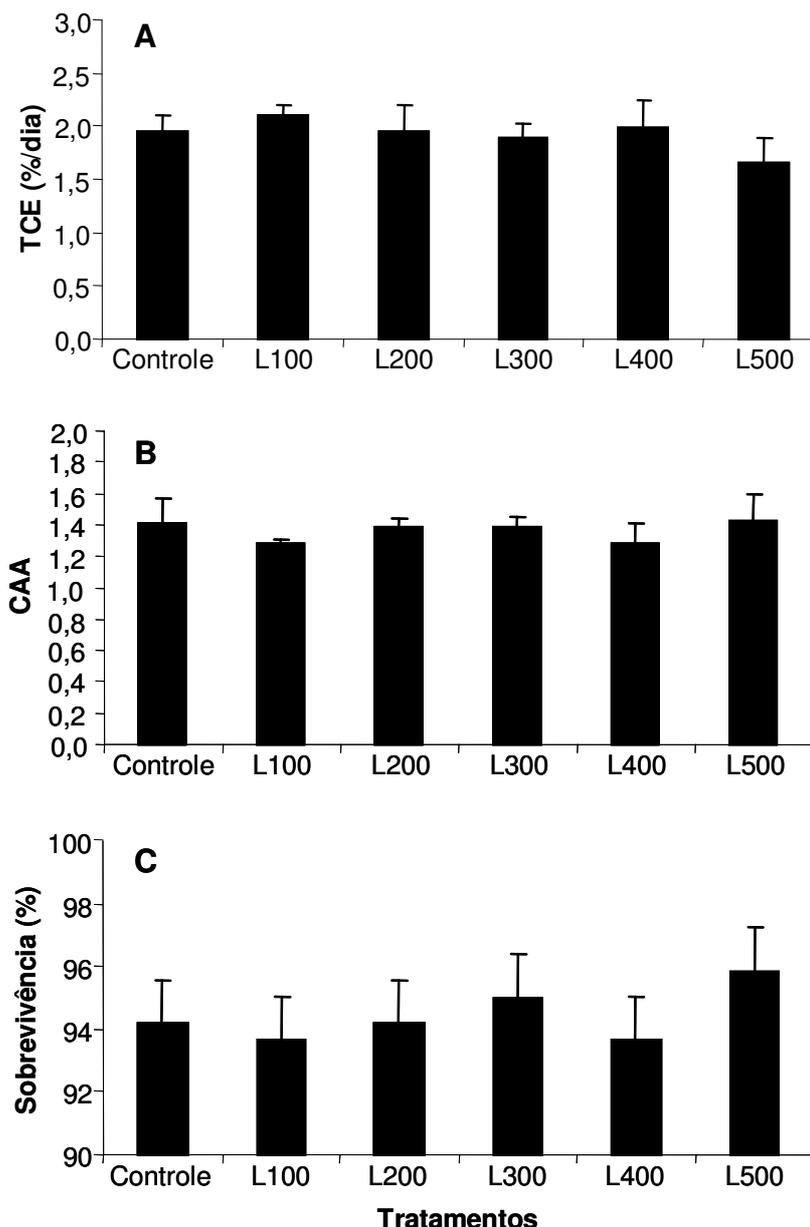


Figura 3. Taxa de crescimento específico – TCE (A), conversão alimentar aparente – CAA (B), e sobrevivência (C) de matrinxãs alimentadas rações suplementadas com diferentes doses de levamisol durante 45 dias. Controle; L100; L200; L300; L400 e L500 com 0, 100, 200, 300, 400, e 500 mg levamisol/kg ração, respectivamente. Média \pm desvio padrão.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores dos parâmetros sanguíneos do matrinxã alimentado com e sem suplementação de levamisol na ração, durante 45 dias. De acordo com as análises estatísticas, o hematócrito, a concentração de hemoglobina total ([Hb]) e celular (CHCM), o volume celular (VCM) e a glicemia não foram influenciados pelos diferentes níveis de levamisol na ração. Entretanto, comparando os valores obtidos para os animais do controle com os demais

tratamentos, foi verificado aumento significativo ($P < 0,05$) no número de eritrócitos e trombócitos no tratamento L300 e proteínas totais no tratamento L100.

Tabela 2. Parâmetros sanguíneos do matrinxã alimentado com ração suplementada com diferentes doses de levamisol durante 45 dias. Controle; L100; L200; L300; L400 e L500 com 0, 100, 200, 300, 400, e 500 mg levamisol/kg ração, respectivamente. Média \pm desvio padrão. VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; Pt = proteínas totais.

Parâmetros	Tratamentos					
	Controle	L100	L200	L300	L400	L500
Hematócrito (%)	33,66 \pm 3,10 ^a	34,13 \pm 5,48 ^a	31,58 \pm 3,18 ^a	33,47 \pm 3,12 ^a	36,00 \pm 2,96 ^a	34,00 \pm 5,01 ^a
Hemoglobina (g/dL)	8,61 \pm 0,98 ^a	9,39 \pm 0,95 ^a	9,07 \pm 1,08 ^a	9,56 \pm 1,12 ^a	9,47 \pm 1,22 ^a	9,37 \pm 1,58 ^a
Eritrócitos (cél/ μ L $\times 10^6$)	2,32 \pm 0,22 ^b	2,46 \pm 0,18 ^{ab}	2,46 \pm 0,25 ^{ab}	2,59 \pm 0,23 ^a	2,33 \pm 0,22 ^b	2,50 \pm 0,25 ^{ab}
VCM (μ m ³ /cel)	145,2 \pm 13,5 ^a	139,5 \pm 17,1 ^a	128,6 \pm 10,1 ^a	129,8 \pm 14,4 ^a	155,0 \pm 13,9 ^a	137,7 \pm 14,0 ^a
CHCM (%)	25,71 \pm 3,19 ^a	28,09 \pm 4,77 ^a	28,85 \pm 3,16 ^a	28,73 \pm 3,79 ^a	26,45 \pm 3,75 ^a	27,20 \pm 3,00 ^a
Leucócitos (cél/ μ L $\times 10^4$)	3,18 \pm 0,91 ^{ab}	4,74 \pm 2,71 ^a	4,10 \pm 1,97 ^{ab}	4,43 \pm 1,68 ^a	2,75 \pm 0,93 ^b	4,55 \pm 1,86 ^{ab}
Trombócitos (cél/ μ L $\times 10^4$)	2,18 \pm 0,70 ^b	2,61 \pm 0,77 ^{ab}	2,48 \pm 0,99 ^{ab}	3,37 \pm 1,09 ^a	2,13 \pm 0,67 ^b	2,95 \pm 1,36 ^{ab}
Glicose (mg/dL)	49,50 \pm 7,40 ^a	57,49 \pm 10,01 ^a	53,36 \pm 7,22 ^a	65,80 \pm 15,02 ^a	51,75 \pm 8,51 ^a	51,92 \pm 8,82 ^a
Pt (g/dL)	2,62 \pm 0,55 ^b	3,05 \pm 0,76 ^a	2,77 \pm 0,87 ^{ab}	2,95 \pm 0,36 ^{ab}	3,00 \pm 0,30 ^{ab}	2,72 \pm 0,66 ^{ab}

Letras diferentes na mesma linha indicam médias diferentes ($p < 0,05$).

3.3 Efeito de diferentes concentrações de levamisol na dieta do matrinxã após infecção com *A. hydrophila*

Para avaliar o efeito da suplementação do levamisol nas respostas fisiológicas do matrinxã, antes e após o teste de desafio com a bactéria *A. hydrophila*, foram considerados como pré-desafio os resultados obtidos durante os 45 dias de suplementação (Tabela 2).

Os resultados dos parâmetros sanguíneos analisados estão expressos na Figura 4. Os níveis de hematócrito (Ht) dos peixes dos tratamentos L200 e L300 não apresentaram alteração, enquanto foi observada queda significativa nos valores desse parâmetro para os demais tratamentos, dos quais apenas o tratamento L100 conseguiu retornar aos níveis iniciais após 14 dias. Os animais infectados apresentaram, ainda, aumento significativo na hemoglobina total ([Hb]) e celular (CHCM) em todos os tratamentos. O volume corpuscular médio (VCM) não apresentou alterações após a inoculação bacteriana ($P > 0,05$). A infecção bacteriana

causou uma redução significativa no número de eritrócitos, independente do tratamento, sendo observadas reduções na contagem dessas células após sete e 14 dias da inoculação, exceto para L100. Os peixes alimentados com rações suplementadas com levamisol, exceto do L400, também apresentaram redução nos leucócitos totais após a infecção ($P < 0,05$), sendo que, após 14 dias infectados, os peixes não haviam recuperado os valores iniciais. Contudo, foi observado aumento no número de trombócitos após infecção, independente do tratamento testado.

A infecção causada pela bactéria *A. hydrophila* não influenciou na glicemia dos peixes, independente do tratamento, mas causou queda significativa nos níveis de proteínas totais dos peixes dos tratamentos L100 e L300, embora esses valores tenham retornado aos níveis semelhantes aos encontrados no pré-desafio após 14 dias da inoculação (Figura 5).

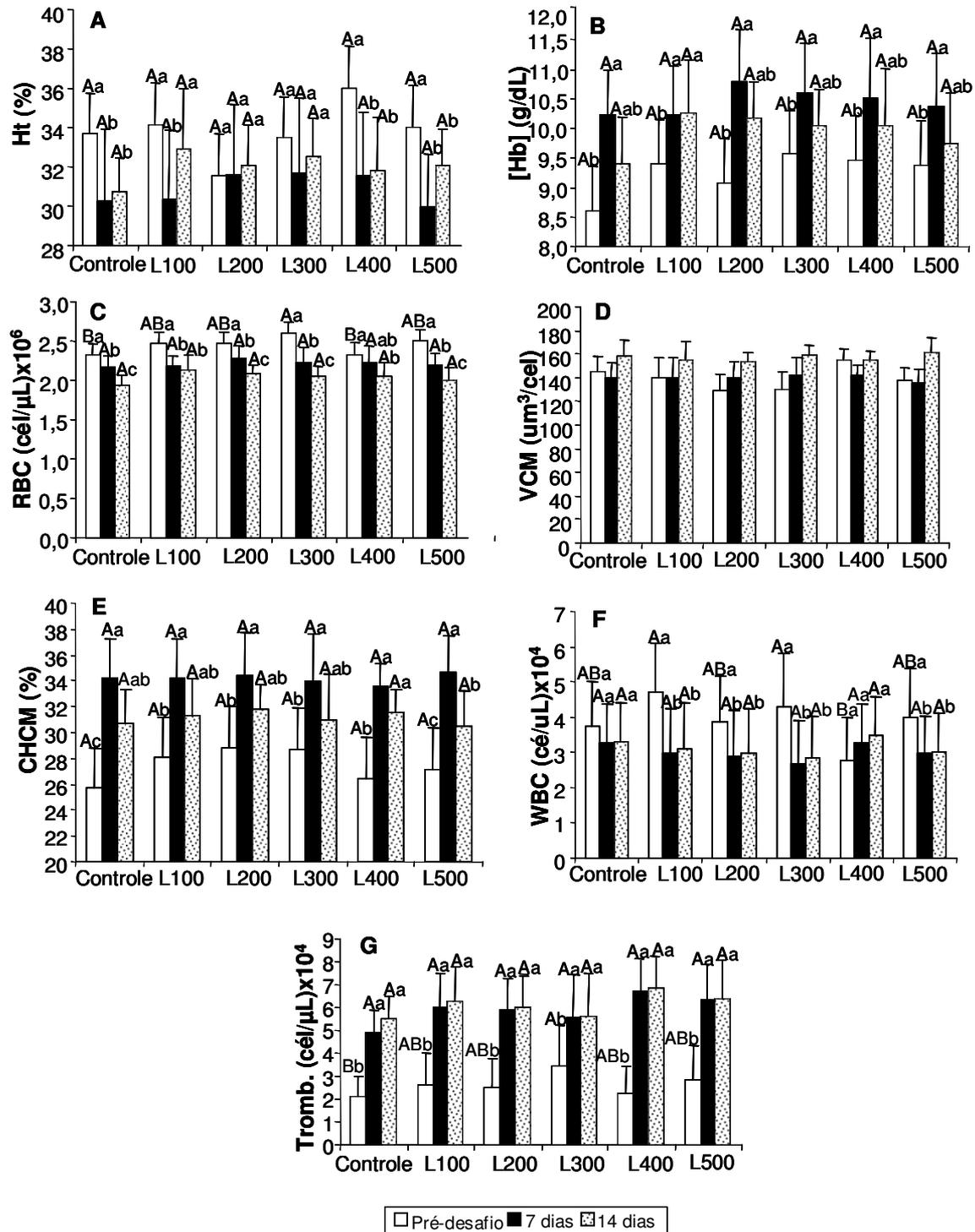


Figura 4. Parâmetros sanguíneos do matrinxã alimentado com rações suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (Pré-desafio) e após 7 e 14 dias do desafio com *A. hydrophila*. Hematócrito – Ht (A), concentração de hemoglobina total - [Hb] (B), número de eritrócitos – RBC (C), volume corpuscular médio – VCM (D), concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM (E), leucócitos – WBC (F), trombócitos (Tromb.). Controle; L100; L200; L300; L400 e L500 com 0, 100, 200, 300, 400, e 500 mg levamisol/kg ração, respectivamente. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas entre o mesmo tratamento nos diferentes tempos ($p < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

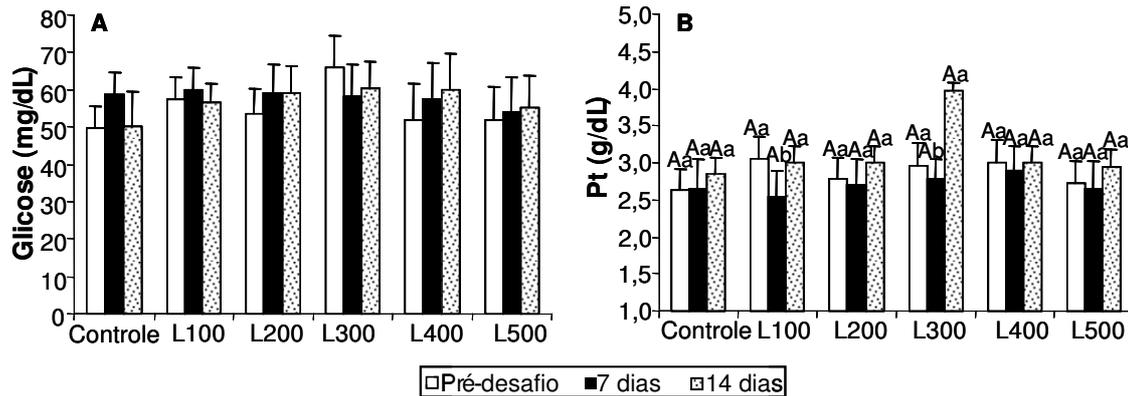


Figura 5. Níveis de glicose (A) e proteínas totais – Pt (B) do matrinxã alimentado com rações suplementadas com diferentes concentrações de levamisol após 7 e 14 dias do desafio com *A. hydrophila*. Controle; L100; L200; L300; L400 e L500 com 0, 100, 200, 300, 400, e 500 mg levamisol/kg ração, respectivamente. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas entre o mesmo tratamento nos diferentes tempos ($p < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

4 DISCUSSÃO

Antibióticos, vacinas e imunostimulantes têm sido amplamente utilizados como medidas profiláticas para controlar doenças em peixes de cultivo (Anderson, 1992). O uso de imunostimulantes, em particular, tem sido bastante difundido, pois não apresenta efeitos negativos ao homem nem ao meio ambiente. Na literatura são descritos vários imunostimulantes eficazes para peixes, dentre eles o levamisol, composto sintético utilizado como agente anti-helmíntico e, mais recentemente, como imunostimulante, embora seu mecanismo de ação sobre as células do sistema imune ainda não esteja totalmente esclarecido (Kumari & Sahoo, 2006).

Estudos sugerem diferentes doses de levamisol como suplemento alimentar (150, 250 e 450 mg/kg de dieta) a fim de melhorar o crescimento e as respostas imunes não específicas de diversas espécies de peixes (Mulero et al., 1998; Leano et al., 2004; Li et al., 2006a; Misra et al., 2006) e, por outro lado, o excesso de levamisol pode apresentar efeitos negativos (Li et al., 2004). A variação dos resultados a respeito da dose necessária para a obtenção de efeitos positivos pode ser explicada pelas diferenças nos métodos de administração do levamisol, a idade dos peixes, seu estado fisiológico, ou mesmo variações inter-específicas (Mulero et al., 1998). Sendo assim, é de extrema importância que seja determinada a dose

ideal, assim como o tempo de suplementação do levamisol, que efetivamente tenham efeito protetor contra agentes patogênicos ou estressores.

Os resultados obtidos para matrinxã alimentado com dieta suplementada com levamisol por 45 dias não apresentaram efeitos significativos no crescimento dos peixes. Esses resultados foram contrários aos descritos por Li et al. (2006b), que observaram melhora de 10% no crescimento e na conversão alimentar do “*hybrid striped bass*” alimentado com doses inferiores a 500 mg de levamisol/kg após três semanas de suplementação. Da mesma maneira, a ingestão de levamisol por *Sparus aurata* teve impacto significativo no tamanho e no peso dos animais após 10 semanas de suplementação (Mulero et al., 1998). Neste estudo, contudo, foi observada tendência a menor consumo de ração e, conseqüentemente, menor ganho de peso, do matrinxã alimentado com a ração contendo 500 mg de levamisol/kg, ao longo do período experimental. Segundo Li et al. (2004), existe uma tolerância espécie-específica ao levamisol, que deve ser determinada, e que o uso excessivo dessa substância pode resultar em depressão do crescimento e redução da eficiência alimentar.

Ainda não foram descritos os mecanismos pelos quais o levamisol influencia positivamente no ganho de peso dos animais. Contudo, é provável que a boa condição fisiológica que ele proporciona ao animal, além de sua ação como anti-helmíntico, possam levar o animal a uma condição de bem estar, estimulando a ingestão de alimento e, ocasionando assim, em melhor ganho de peso. Neste estudo, embora não tenha sido observado incremento nos parâmetros zootécnicos dos peixes alimentados com ração suplementada com levamisol, os resultados apresentados foram satisfatórios para a produção de matrinxã, o que demonstra a qualidade em que foi conduzido o bioensaio. Para avaliação do real efeito do levamisol como agente promotor de crescimento para o matrinxã, seria interessante a condução de outros estudos em condições de cultivo, nas quais os animais possam estar sujeitos aos fatores estressantes intrínsecos da produção, como altas densidades populacionais, alterações na qualidade da água e até mesmo o parasitismo.

Os índices hematológicos são parâmetros importantes para avaliação do estado fisiológico dos peixes, pois estão diretamente relacionados com a resposta do animal ao ambiente (Vázquez & Guerrero, 2007). Esses índices têm sido amplamente utilizados no monitoramento das respostas dos peixes à estressores

(Svobodová et al., 1994). Os parâmetros sangüíneos de matrinxã, embora tenham apresentado algumas alterações durante o período de alimentação e após o desafio, indicam a capacidade adaptativa desta espécie em manter a homeostase fisiológica frente a um agente estressor. A alimentação com levamisol, de maneira geral, aumentou o número de eritrócitos em todos os tratamentos e, conseqüentemente, a concentração de hemoglobina, sugerindo melhor capacidade de transporte de oxigênio por esses animais.

Após a inoculação bacteriana, o matrinxã não apresentou resposta diferenciada nos tratamentos com e sem suplementação na dieta. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Andrade et al. (2006) com matrinxãs alimentados com dieta suplementada com vitamina C e submetidos à infecção pela *A. hydrophila*, cujos valores dos parâmetros hematológicos não sofreram alterações. Entretanto, o efeito do estresse pela bactéria causou alterações no perfil hematológico dos peixes, particularmente nos valores de Ht, RBC, [Hb] e CHCM, após sete dias do desafio. De acordo com os resultados obtidos, a diminuição nos valores de Ht foi conseqüência da diminuição no RBC. Entretanto, a capacidade de transporte do oxigênio aos tecidos não foi comprometida, visto que houve aumento na síntese de hemoglobina, confirmada pelos valores da [Hb] e CHCM. Harikrishnan et al. (2003) já haviam descrito que a infecção causada por *Aeromonas hydrophila* resulta em prejuízo na síntese de células sangüíneas para a carpa comum, *Cyprinus carpio*. Assim como no presente estudo, Falcon (2007) concluiu que a suplementação de β -glucano e de vitamina C na dieta da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, não foi capaz de manter a eritropoiese nos padrões considerados adequados para animais sadios.

A primeira defesa contra os agentes patogênicos que afetam o animal é produzida pelo sistema imune não específico, evidenciada pelas alterações no número de leucócitos e trombócitos (Bozzo et al., 2007; Garcia et al., 2007). Os leucócitos podem ser também bons indicadores de estresse fisiológico em peixes, apesar dos poucos resultados para peixes tropicais (Affonso et al., 2004; Tavares-Dias & Moraes, 2004; Andrade et al., 2007). Embora para alguns autores os trombócitos não sejam incluídos como célula leucocitária (Hrubec et al., 2001; Ranzani-Paiva et al., 2003), para outros estas células, além de apresentarem função hemostática, agem também como células de defesa, apresentando atividade fagocítica (Kozinska et al., 1999; Bozzo et al. 2007).

Diversos estudos mostraram que a alimentação com imunostimulantes pode levar ao aumento no número de leucócitos. Por exemplo, *C. carpio* alimentados com β -glicano+lipopolissacarídeo mostraram aumento significativo no WBC, que foi diretamente proporcional às doses utilizadas (Selvaraj et al., 2006). Da mesma maneira, a suplementação com altas doses de vitamina C causou aumento significativo do WBC em matrinxã (Affonso, et al., 2007), em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Garcia et al., 2007) e em pirarucu, *Arapaima gigas* (Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). Contudo, os resultados desses parâmetros para matrinxã, neste estudo, não foram influenciados pelas diferentes concentrações de levamisol na dieta.

Entretanto, após o desafio com a bactéria, a adição de levamisol na dieta influenciou negativamente no número de leucócitos dos peixes. A leucopenia foi anteriormente descrita por Barton e Iwana (1991), que ressaltaram que a diminuição no número total leucócitos pode ser acompanhada por linfopenia em condições de estresse. Vários estudos têm relacionado a diminuição no número de células brancas totais com os altos níveis de cortisol e catecolaminas em situações de estresse (Pickering & Pottinger, 1985; Barton & Iwana, 1991; McDonald & Milligan, 1992). No presente estudo, diferente dos leucócitos, os valores de trombócitos do matrinxã sofreram aumento após a inoculação bacteriana, independente do tratamento testado. Esses resultados corroboram com aqueles descritos por diversos autores (Martins, 2000; Bozzo et al., 2007; Garcia et al., 2007) sobre a importância desta célula nos mecanismos de defesa do organismo, as quais são células predominantes nos exudatos inflamatórios.

Além dos índices hematológicos, os níveis glicêmicos são importantes indicadores de estresse em peixes em condições de cultivo (Hattingh, 1986; Wendelaar-Bonga, 1997). Em situações de estresse, os peixes, geralmente utilizam suas reservas de glicogênio hepático por meio de glicogenólise, disponibilizando maior quantidade de energia para o organismo se adaptar às condições desfavoráveis (Iwama et al., 2004). Em condições de bioensaio por 45 dias, os peixes alimentados com rações suplementadas e não suplementadas com levamisol não mostraram necessidade de uma maior demanda energética. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com outros imunostimulantes, como superdose de vitamina C na dieta do matrinxã durante 60 dias (Affonso et al., 2007), e o β -glicano, fornecido durante 42 dias para o *Labeo rohita* (Misra et al., 2006). A

glicose plasmática dos animais sob efeito da bactéria *A. hydrophila* não mostrou qualquer alteração nos diferentes tratamentos e tempos de exposição, embora tenham sido verificados valores superiores aos do bioensaio. Isto, provavelmente, deve-se a alta tolerância do matrinxã a bactéria *A. hydrophila* (DL_{50} 96-h = $6,66 \times 10^{11}$ células/mL), submetido ao teste desafio com solução bacteriana com apenas 60% da DL_{50} .

Alterações nas proteínas totais, além de bons indicadores de estresse fisiológico, estão associadas a uma maior resposta imune nos peixes (Wiegertjes et al., 1996). O aumento de proteínas totais no plasma pode ser indicativo da presença de lisozimas, imunoglobulinas, anticorpos e componentes do sistema complemento. Neste estudo, a alimentação com levamisol durante 45 dias causou aumento nos níveis de proteínas totais, cujos valores obtidos no tratamento L100 apresentaram diferença significativa com relação ao controle. Outras substâncias imunoestimulantes têm mostrado efeitos positivos na síntese de proteínas plasmáticas. Misra et al. (2006), observaram aumento significativo nos níveis de proteínas totais após suplementação de *L. rohita* com β -glicano. Para o pirarucu, *A. gigas*, a adição das vitaminas C e E na dieta, proporcionou níveis altos de proteínas totais, tanto em condições experimentais, como em produção em tanque-rede (Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). Para *Labeo rohita* (Sahoo & Mukherjee, 2001) e *Clarias batrachus* (Kumari & Sahoo, 2006), contudo, as concentrações de proteínas totais no plasma não foram influenciadas pela suplementação de levamisol na dieta.

É descrito na literatura que a infecção por bactérias ou parasitas resulta na diminuição nos níveis de proteínas totais no plasma de peixes (Wedemeyer & McLeay 1981; Boon et al., 1990). Neste estudo, contudo, foi observada diminuição nos níveis de proteínas totais após sete dias da inoculação bacteriana nos peixes alimentados com 100 e 300 mg de levamisol/kg de dieta, recuperando os níveis encontrados antes do desafio após 14 dias. Resultados semelhantes foram observados para o pacu, *P. mesopotamicus*, alimentado com dietas suplementadas com vitaminas C e E, que apresentou diminuição nos níveis de proteínas plasmáticas após desafio com *A. hydrophila* (Garcia et al., 2007).

Assim, com os resultados obtidos neste estudo é possível concluir que: 1) em condições experimentais (bioensaio), a suplementação com levamisol em baixas concentrações proporcionou um estado fisiológico adequado para o matrinxã,

promovendo melhores condições para o transporte de oxigênio e para o sistema imune não-específico, e; 2) o levamisol não foi capaz de minimizar as respostas de estresse evidenciadas pela infecção por *A. hydrophila*. Contudo, para se obter resultados conclusivos sobre o efeito do levamisol como imunoestimulante para o matrinxã, sugere-se a realização de experimentos em sistema de produção, assim como diferentes períodos de suplementação e a avaliação de indicadores imunológicos não-específicos, como a concentração e atividade de lisozimas e a atividade respiratória de leucócitos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Affonso, E.G.; Silva, E.C.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Carvalho, C.S.M.; Nunus, E.S.S.; Ituassu, D.R.; Roubach, R.; Ono, E.A.; Fim, J.D.I.; Marcon, J.L. 2007. Effect of high levels of vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 147: 383-388.
- Affonso, E.G.; Polez, V.L.P.; Mazon, A.F.; Araújo, M.R.R.; Moraes, G.; Rantin, F.T. 2004. Physiological responses to sulfide toxicity by the air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 139: 251-257.
- Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Brasil, E.M.; Matsuura, T.; Souza, R.T.Y.B.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Fernandes, E.B.; Affonso, E.G. 2006. Lethal dose (LD₅₀) of *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. Abstracts of the 41th Congress of the Brazilian Physiological Society, Ribeirão Preto, SP, p 209.
- Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Menezes, G.C.; Fernandes, E.B.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinatti, E.C.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146: 576–580.
- Anderson, P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 281-307.
- Anderson, D.P.; Siwicki, A.K.; Dixon, O.W.; Lizzi, E.F. 1989. Immunostimulation by levamisole in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *in vivo*. In: Ahne, W.; Kurstak, E. (Eds.) *Viruses of lower vertebrates*. Springer-Verlag, Nova York, p. 469-478.
- Arana, L.V. 1997. *Princípios químicos de qualidade de água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões*. UFSC, Florianópolis, Santa Catarina. 166pp.

- Barton, B.A.; Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- Boon, J.H.; Cannaerts, V.M.H.; Augustijn, H.; Machiels, M.A.M.; De Charleroy, D.; Olliver, F. 1990. The effect of different infection levels with infective larvae of *Anguillicola crassus* on hematological parameters of European Eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture*, 87: 243-253.
- Boyd, E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn University, Auburn, Alabama, EUA. 183pp.
- Bozzo, F.R.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R.; Pereira, G.T.; Tavares-Dias, M.; Onaka, M. 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2):302-308.
- Bricknell, I.; Dalmo, R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 457-472.
- Chagas, E.C.; Val, A.L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(3): 397-402.
- Cuesta, A.; Meseguer, J.; Esteban, M.A. 2002. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89: 169-174.
- Falcon, D.R. 2007. *β -glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 146pp.

- Findlay, V.L.; Munday, B.L. 2000. The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 358(23): 369-78.
- Garcia, F.; Pilarski, F.; Onaka, E.M.; Moraes, F.R.; Martins, M.L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 271: 39–46.
- Geets, A.; Liewes, E.W; Ollivier, F. 1992. Efficacy of some anthelmintics against the swimbladders nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13: 123-128.
- Gopalakannan, A.; Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255(1-4): 179-187.
- Harikrishnan, R.; Nisha Rani, M.; Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*, 221: 41-50.
- Hattingh, J. 1986. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater *Labeo capensis*. *Journal of Fish Biology*, 40:191-195.
- Hrubec, T.C.; Smith, S.A.; Robertson, J.L. 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone Chrysops* x *Morone saxatilis*). *Veterinary Clinics Pathology*, 30: 8-15.
- Iwama, G.; Afonso, L.; Todgham, A.; Ackerman, P.; Nakaro, K. 2004. Are Hsp suitable for indicating stresses status in fish? *The Journal of Experimental Biology*, 20:15-19.
- Jeney, G.; Galeotti, M.; Volpatti, D.; Jeney, Z.; Anderson, D.P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 54(1): 1-15.

- Koch, A.L. 1994. Growth measurements. In: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. (Eds). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society of Microbiology, Washington, Columbia, p. 248-277.
- Kozinska, A.; Antychowicz, J.; Kostrewa, P. 1999. Influence of Thrombocyte activity on the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different temperature. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 43: 43-53.
- Kubitza, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. F. Kubitza, Jundiaí, São Paulo. 229pp.
- Kumari, J.; Sahoo, P. 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 37: 500-509.
- Leano, E.M.; Guo, J.J.; Chang, S.L.; Liao, I.C. 2004. Levamisole enhances non-specific immune responses of Cobia, *Rachycentron canadum*, fingerlings. *Journal of Fisheries Society of Taiwan*, 30: 321-330.
- Li, P.; Wang, X.; Gatlin III, D.M. 2004. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid "striped bass", *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, and elevated levamisole *in vitro* impairs macrophage function. *Aquaculture Research*, 35: 1380-1383.
- Li, G.; Guo, Y.; Zhad, D.; Qian, P.; Sun, J.; Xiao, C.; Liang, L. Wang, H. 2006a. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fucus*. *Aquaculture*, 253: 212-217.
- Li, P.; Wang, X.; Gatlin III, D.M. 2006b. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Aquaculture*, 251: 201-209.

- Lima, F.C.T. 2003. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Orgs). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDPURCS, Porto Alegre. p. 174-181.
- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (Overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2): 137-151.
- Martins, M.L. 2000. *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados*. Dissertação de Doutorado. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 123pp.
- McDonald, D. G.; Milligan, C. L. 1992: Chemical properties of the blood. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Farrell, A.P. (Eds). *Epithelial transport in the lower vertebrates*. Academic Press, New York, USA, pp. 55–133.
- 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. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145(2): 274-279.
- Misra, C.K.; Das, B.K.; Mukherjee, S.C.; Pattnaik, P. 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255: 82-84.
- Montero, D.; Marrero, M.; Izquierdo, M.S.; Robaina, L.; Vergara, J.M.; Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus auratus*) juvenilis subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.

- Mulero, V.; Esteban, M.A.; Munoz, J.; Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 49-62.
- Munday, B.L.; Zilberg, D. 2003. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(1): 3-6.
- Natt, M.P.; Herrick, C.A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31: 735-738.
- Pickering, A.D.; Pottinger T.G.; 1985. Factors influencing blood cortisol levels of brown trout under intensive culture conditions. In: Lofts. B.; Holms, W.N. (Eds). *Current Trends in Endocrinology*, Hong Kong University, pp. 1239-1242.
- Ranzani-Paiva, M.J.T.; Rodríguez, E.L.; Veiga, M.L.; Eiras, A.C.; Campos, B.E.S. 2003. Differential leukocyte counts in "dourado", *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu river, Pirassununga, SP. *Brazilian Journal of Biology*, 63(3): 517-525.
- Roubach, R.; Correia, E.S.; Zaiden, S.; Martino, R.C.; Cavalli, R.O. 2003. Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture*, 34: 28-35.
- Sahoo, P.K.; Mukherjee, S.C. 2001. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of healthy and aflatoxin-induced immunocompromised rohu, *Labeo rohita*. *Journal of Applied Aquaculture*, 11: 15-25.
- Sahoo, P.K.; Mukherjee, S.C. 2002. The effect of immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 12: 1-16.

- Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(1-2): 15-24.
- Siwicki, A.K.; Anderson, D.P.; Dixon, O.W. 1990. *In vitro* immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Developmental and Comparative Immunology*, 14: 231-237.
- Svobodová, Z.; Vykusová, B.; Máchová, J. 1994. The effect of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. In: Müller, R.; Lloyd, R. (Eds). *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. FAO - Fishing News Books, Cambridge, p. 39-52.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, 19: 103-110.
- Tavares-Dias, M.; Mataqueiro, M.I.; Perecin, D. 2002. Total leukocyte counts in fishes by direct or indirect methods. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 28(2): 155-161.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. M. Tavares-Dias, Ribeirão Preto, São Paulo. 144pp.
- Vazquez, G.R.; Guerrero, G.A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell*, 39: 151-160.
- Verdouw, H.; Van Eched, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*, 12(6): 397-402.

- Volpatti, D.; D'angelo, L.; Jeney, G.; Jeney, Z.; Anderson, D.P.; Galeotti, M. 1998. Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3–4): 201–206.
- Wedemeyer, G.A.; McLeay, D.J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Pickering A.D. (Ed). *Stress and fish*. Academic Press, p. 247-275.
- Wendelaar-Bonga, S.E.W. 1997. The stress response in fish. *Physiology Review*, 77:591-625.
- Wiegertjes, G.F.; Stet, R.J.M.; Parmentier, H.K.; Vas Muiswinkel, W.B. 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparable approach. *Developmental and Comparative Immunology*, 20: 365-381.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematology*, 51: 32-49.

CAPÍTULO 4

Efeito da suplementação de levamisol no estresse por transporte de matrinxã, *Brycon amazonicus*

RESUMO

Esse estudo avaliou o efeito da suplementação alimentar com levamisol, durante diferentes períodos, nas respostas fisiológicas de estresse do matrinxã, *Brycon amazonicus*, após cinco horas do transporte. Para isso, foram utilizados quatro tratamentos: TR1 (controle - sem levamisol) e TR2, TR3 e TR4, com 100 mg de levamisol/kg durante seis, 12 e 18 dias antes do transporte, respectivamente. Antes e imediatamente após o transporte, e em 24, 48 e 96 h de recuperação, foram avaliadas as respostas primárias e secundárias de estresse. Independente do tratamento testado, os peixes apresentaram hiperglicemia, aumento no número de eritrócitos, aumento da hemoglobina total e celular e diminuição no volume celular e nos níveis de cloreto plasmático. Os peixes dos tratamentos com levamisol apresentaram aumento nos níveis de cortisol após o transporte, estando este associado à diminuição no número de leucócitos e trombócitos circulantes. Os resultados sugerem que a suplementação com levamisol não foi capaz de minimizar os efeitos fisiológicos negativos causados pelo transporte no matrinxã, podendo ainda apresentar efeito imunossupressor sobre leucócitos e trombócitos. Entretanto, os efeitos do estresse sobre os peixes dos tratamentos com e sem suplementação de levamisol demonstraram a capacidade adaptativa dessa espécie em recuperar a homeostase fisiológica, sendo os períodos mais críticos as primeiras 24 h de recuperação após o transporte.

Palavras-chave: estresse, imunoestimulante, levamisol, matrinxã, transporte.

ABSTRACT

Effect of dietary levamisole on the stress responses of matrinxa, *Brycon amazonicus*

This study evaluated the effect of dietary levamisole, for different supplementation periods, on the physiological stress responses of matrinxa, *Brycon amazonicus*, to a five-hour transport. Different treatments were tested: TR1 (control feed), and TR2, TR3 and TR4, which were supplemented with 100 mg levamisole chloridrate/kg during six, 12 and 18 days prior to transport, respectively. The effects were evaluated by measuring primary and secondary stress responses in five sampling assays: before and immediately after transport, and at 24, 48 and 96 hours of recovery. The results show that fish from all treatments presented hyperglycemia, increased number of erythrocytes, increased total and cellular hemoglobin, and decreased cellular volume and plasmatic chloride levels. Fish fed diets supplemented with levamisole also presented increased cortisol levels after transport, which were related to the decrease in leukocytes and thrombocytes count. The results suggest that levamisole supplementation was not able to mitigate the negative effects caused by the transport of matrinxa, and it could also present an immunosuppressive effect in leukocytes and trombocytes. However, the stress effects observed in fish from treatments with and without levamisole supplementation demonstrated the adaptative capacity of this species in recovering physiological homeostasis, in which the most critical period was the first 24 hours after transport.

Key-words: *Brycon amazonicus*, immunostimulant, levamisole, stress, transport.

1 INTRODUÇÃO

O transporte de peixes vivos é uma prática rotineira na piscicultura intensiva e, considerado, por diversos autores, como importante fonte de estresse (Barton & Peter, 1982; Robertson et al., 1987). Isto ocorre porque todas as fases envolvidas no transporte são traumáticas e geradoras de estresse e expõem os peixes a uma série de estímulos que podem causar danos à saúde e, conseqüentemente, levar a sua morte (Carmichel et al., 1983; Lim et al., 2003; Bendack, 2004; Urbinati et al., 2004; Inoue, 2005).

Na luta pela sobrevivência, os peixes reagem com complexo conjunto de respostas adaptativas (Chrousos, 1998), classificadas por alguns autores como primárias, secundárias e terciárias (Wedemeyer, 1996; Barton, 2002; Urbinati & Carneiro, 2004). Respostas primárias consistem na liberação dos hormônios cortisol e catecolaminas (Urbinati & Carneiro, 2004) e as respostas secundárias

são decorrentes da liberação desses hormônios, e incluem hiperglicemia, desequilíbrio osmótico e eletrolítico, alterações nas variáveis hematológicas e imunossupressão, entre outras (Wedemeyer, 1996; McDonald & Milligan, 1997; Mommsen et al., 1999; Tavares-Dias & Moraes, 2004; Urbinati et al., 2004). As respostas terciárias incluem mudanças no comportamento, diminuição do crescimento e do desempenho reprodutivo e aumento da suscetibilidade à doenças (Wedemeyer & McLeay, 1981).

Para minimizar tais efeitos negativos do transporte é importante que sejam realizados procedimentos e técnicas preparatórias relacionadas ao peixe, à água, aos equipamentos e ao manejo envolvido nesta operação (Grøttum et al., 1997; Kubtiza, 1999; 2003; Carneiro & Urbinati, 2002; Lim et al. 2003; Gomes & Urbinati, 2005; Gomes et al., 2006). Alguns estudos têm mostrado que o uso de imunoestimulantes, principalmente como medida profilática, minimiza o estresse fisiológico em peixes cultivados (Hardie et al., 1991; Jeney et al., 1997; Volpatti et al., 1998; Menezes et al., 2006; Okamura et al., 2007; Affonso et al., 2007), pois os objetivos da imunoestimulação incluem não somente a promoção da resposta imune contra agentes infecciosos, mas também a superação dos efeitos imunossupressivos causados pelo estresse (Anderson, 1992).

Existem inúmeras substâncias que atuam como imunoestimulantes, entretanto, são poucas aquelas adequadas para uso na aquicultura (Sakai, 1999). Dentre essas o levamisol tem sido testado em diversas espécies para melhorar as respostas imunes não específicas (Purzyc & Calkosinski, 1998; Gopalakannan & Arul, 2006) e aumentar a resistência contra bactérias patogênicas e parasitas (Geets et al., 1992; Sahoo e Mukherjee, 2002; Munday & Zilberg, 2003; Gopalakannan & Arul, 2006). Os efeitos da suplementação com levamisol apresentam relação direta com a concentração utilizada, a forma e o período de suplementação (Jeney & Anderson, 1993; Jeney et al., 1994; Mulero et al., 1998; Safi et al., 2006; Ispir & Yonar, 2007). Essas são informações importantes, pois, na prática, o custo da dieta implica em aumento de custos e mão-de-obra para a produção.

O matrinxã, *Brycon amazonicus*, espécie nativa da bacia Amazônica (Lima, 2003) de grande interesse para a agroindústria de pescado em todo o

Brasil (Izel & Melo, 2003), embora bem adaptado ao cativeiro, é sensível ao manuseio e transporte, apresentando alta mortalidade após tais práticas (Kubitza, 1999; Inoue et al., 2003). Frente ao grande interesse do setor produtivo no cultivo dessa espécie, este estudo avaliou a eficiência da suplementação do levamisol na dieta do matrinxã como mitigador do estresse do transporte. Para isso, foram avaliadas as respostas fisiológicas desencadeadas pelos peixes antes e após o transporte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Após período de aclimação, os peixes foram uniformizados por tamanho utilizando um classificador de barras. Em seguida, foram pesados ($17,65 \pm 1,92$ g), e distribuídos em quatro grupos de 140 animais em tanques de fibra de vidro de 2000 litros, abastecidos, individualmente, com água de poço semi-artesiano, com renovação contínua.

Foram utilizados quatro tratamentos com três réplicas cada, totalizando 12 unidades experimentais: TR1 = controle (ração sem adição de levamisol); TR2 = (ração + levamisol durante seis dias antes do transporte); TR3 = (ração + levamisol durante 12 dias antes do transporte) e TR4 = (ração + levamisol durante 18 dias antes do transporte). A concentração de levamisol utilizada foi 100 mg de cloridrato de levamisol/kg, de acordo com os resultados obtidos no Capítulo 3 para esta espécie. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente duas vezes ao dia (09:00 h e 17:00 h).

Após seis, 12 e 18 dias de alimentação com ração com e sem suplementação de levamisol, os peixes foram mantidos em jejum por 48 horas para o esvaziamento gastrointestinal (Kubitza, 1999). Em seguida, foram transferidos para 12 tambores de PVC com 20 litros de água cada e 0,6% de sal (NaCl) (Carneiro & Urbinati, 2001) para a realização do transporte. Os tambores receberam oxigênio puro difundido por pedras porosas durante todo o transporte, que teve duração de cinco horas. Após o transporte, os peixes foram transferidos para tanques de PVC de 500 L, com aeração e fluxo de água contínuos, para recuperação. Amostras de sangue foram coletadas de

seis peixes por réplica, por meio de punção caudal, antes e imediatamente após o transporte, e 24, 48 e 96 horas após o transporte.

2.2 Preparo da ração suplementada com levamisol

A suplementação do levamisol foi feita em ração extrusada comercial contendo 36% de proteína bruta. A ração foi triturada, usando um moinho de martelo com peneira com mesh de 1 mm, e acrescentado levamisol para completar 100 mg de levamisol/kg. Em seguida, a mistura foi umedecida com 350 mL de água/kg, sendo a massa peletizada num moedor de carne (Marca CAF, modelo 22S). Os peletes foram secos em estufa a 40 °C, resfriados, embalados e armazenados a -20 °C. Para o controle, a mesma ração comercial foi preparada sem a suplementação de levamisol.

2.3 Monitoramento da qualidade de água

Todos os métodos estão descritos em detalhes no Capítulo 3, sendo, portanto, citados resumidamente neste capítulo.

Antes do início dos experimentos e durante todo o processo experimental, foram feitas análises físico-químicas da água. A concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica e pH foram medidos diariamente às 9:00 horas, enquanto que as análises de amônia, nitrito, alcalinidade, dureza e CO₂ foram realizadas semanalmente.

Oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade foram determinados utilizando medidor multiparamétrico digital, e o pH foi medido com medidor de pH digital. As concentrações de amônia total (NH₃ + NH₄⁺) foram determinadas pelo método colorimétrico segundo Verdouw (1978) e os valores de amônia não ionizada foram calculados segundo Kubitzka (2003). A concentração de nitrito (NO₂⁻) foi determinada pelo método colorimétrico de Boyd & Tucker (1992). A alcalinidade e dureza foram determinadas por meio de titulação descrita por Boyd & Tucker (1992). O gás carbônico medido segundo Boyd & Tucker (1992), porém, utilizando adaptação para o mínimo contato com o ar atmosférico.

2.4 Coletas de sangue e análises

Todos os métodos, exceto determinação de íons e cortisol, estão descritos em detalhes no Capítulo 3, sendo, portanto, citados resumidamente neste capítulo.

Após a coleta de sangue, foram feitas as determinações do hematócrito (Ht), do número de eritrócitos (RBC) e da dosagem de hemoglobina ([Hb]) utilizando-se os métodos clássicos. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de Ht, [Hb] e RBC. A contagem dos leucócitos totais (WBC) foi feita utilizando-se as extensões sangüíneas segundo Tavares-Dias et al. (2002), após serem previamente coradas pelo método de coloração rápida May Grünwald-Giemsa Wright (MGGW), segundo Tavares-Dias & Moraes (2003). Após a centrifugação do sangue, o plasma foi utilizado para a determinação da glicose e proteína total, pelo método enzimático-colorimétrico e pelo método biureto, respectivamente, utilizando kits comerciais (marca Doles).

A concentração dos íons Na^+ e K^+ foi determinada utilizando-se fotômetro de chama (marca DIGMED, modelo DM-61), após diluição do plasma na água (1:100). A concentração de íons Cl^- foi medida utilizando-se kit comercial (marca Sigma nº 461-3) com absorvância de 490 nm, em uma Leitora de microplacas (marca DYNEX TECHNOLOGIES, INC., modelo MRX-HD). Os resultados são apresentados em mEq/L.

O cortisol plasmático foi determinado pelo método de Elisa, utilizando-se leitora de microplaca (marca DLS Active, modelo EIA DSL -10 -2000 ACTIVE), com leitura de 450 nm com meio de correção de comprimento de onda de 600 ou 620 nm. O procedimento segue o princípio básico de imuno-ensaio enzimático, onde há competição entre um antígeno não marcado e um antígeno enzima-marcado por um número fixo de sítios que se ligam ao anticorpo. Os resultados foram calculados por meio de uma curva padrão em ng/mL.

2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados dos tratamentos e da qualidade da água foram determinados mediante a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo. Os tratamentos que apresentaram diferenças significativas tiveram as médias comparadas pelo Teste de Tukey, sendo ambas as análises realizadas a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando o software Statsoft Statistica versão 6.0.

3 RESULTADOS

Os parâmetros físicos-químicos da água não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos, durante seis, 12 e 18 dias de alimentação com dieta suplementada com levamisol (Tabela 1), permanecendo dentro das condições adequadas para o cultivo de organismos aquáticos (Arana, 1997; Kubitzka, 2003).

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 2, a qualidade da água, após cinco horas de transporte, apresentou alterações significativas. Em todos os tratamentos, foi observado aumento nos valores médios de temperatura, concentração de amônia total, amônia tóxica, nitrito e CO_2 comparados aos valores obtidos antes do transporte. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, exceto para a concentração de amônia total, que foi mais elevada nos tratamentos TR1 e TR3. Houve diminuição nos valores de condutividade elétrica após o transporte, não havendo diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 1. Oxigênio dissolvido (OD), temperatura, condutividade elétrica (CE), pH amônia total ($\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$), amônia não ionizada (NH_3), nitrito (NO_2^-), dióxido de carbono (CO_2), alcalinidade total (AT) e dureza total (DT) da água de cultivo do matrinxã (*B. amazonicus*) nos diferentes tratamentos: TR1= controle; TR2= ração + levamisol por seis dias; TR3= ração + levamisol por 12 dias e TR4= ração + levamisol por 18 dias antes do transporte.

Parâmetros	Tratamentos			
	TR1	TR2	TR3	TR4
OD (mg/L)	5,62±0,47	5,94±0,35	5,99±0,40	6,29±0,43
Temperatura (°C)	28,1±0,54	28,2±0,51	28,2±0,52	28,1±0,52
CE ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)	25,61±2,62	25,65±2,00	25,71±2,04	25,58±1,99
pH	6,67±0,36	6,69±0,33	6,69±0,30	6,6±0,40
$\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ (mg/L)	0,154±0,02	0,149±0,04	0,135±0,06	0,134±0,01
NH_3 (mg/L)	< 0,000	< 0,000	< 0,000	< 0,000
NO_2^- (mg/L)	0,025±0,001	0,026±0,003	0,028±0,002	0,028±0,003
CO_2 (mg/L)	10,0±0,0	10,0±0,0	10,0±0,0	10,0±0,0
AT (mg/L de CaCO_3)	76,5±0,50	76,0±0,75	70,75±0,41	68,25±0,75
DT (mg/L de CaCO_3)	17,52±2,50	17,52±2,50	20,02±0,52	17,52±2,75

Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 2. Oxigênio dissolvido (OD), temperatura, condutividade elétrica (CE), pH amônia total ($\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$), amônia não ionizada (NH_3), nitrito (NO_2^-), dióxido de carbono (CO_2), alcalinidade total (AT) e dureza total (DT), da água após 5 h de transporte do matrinxã (*B. amazonicus*). TR1= controle; TR2= ração + levamisol durante seis dias antes do transporte; TR3= ração + levamisol durante 12 dias antes do transporte e TR4= ração + levamisol durante 18 dias antes do transporte. Asteriscos indicam diferença com nível inicial. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos, ($p<0,05$).

Parâmetros	Tratamentos			
	TR1	TR2	TR3	TR4
OD (mg/L)	3,88±0,08	4,26±0,11	4,51±0,12	4,93±0,14
Temperatura (°C)	34,2±0,63*	32,0±0,68*	32,6±0,44*	32,2±0,80*
CE ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)	11,09±0,87*	10,47±0,86*	10,88±0,98*	10,9±0,98*
pH	6,53±0,54	6,63±0,26	6,47±0,18	6,50±0,32
$\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ (mg/L)	6,72±0,12 ^a	5,95±0,17 ^b	6,65±0,24 ^a	5,86±0,33 ^b
NH_3^- (mg/L)	0,021±0,03*	0,022±0,004*	0,019±0,005*	0,017±0,002*
NO_2^- (mg/L)	0,040±0,009*	0,038±0,007*	0,043±0,007*	0,035±0,004*
CO_2 (mg/L)	22,5±2,5*	20,0±1,30*	20,8±1,44*	20,8±1,44*
AT (mg/L de CaCO_3)	70,5±0,54	68,3±0,68	61,75±0,69	61,25±0,58
DT (mg/L de CaCO_3)	15,23±2,20	14,98±2,32	18,42±2,45	15,28±2,38

Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Durante todo o período experimental não foi observada mortalidade de peixes nos diferentes tratamentos. Os valores médios correspondentes aos parâmetros sanguíneos dos animais antes e imediatamente após o transporte e em 24, 48 e 96 h de recuperação estão apresentados nas Figuras 1 a 6.

Os valores de cortisol apresentaram aumento significativo imediatamente após o transporte para os peixes do TR2, e, após 24 h de recuperação, nos peixes dos tratamentos TR3 e TR4 (Figura 1A). Os níveis de cortisol dos peixes alimentados com ração sem levamisol não apresentaram alteração durante todo o período experimental. Após 24 e 48 h de recuperação, os valores de glicose foram significativamente elevados ($P < 0,05$) em todos os tratamentos (Figura 1B), retornando após 96 h aos níveis verificados antes e ao final do transporte.

Na Figura 2 estão representados os valores médios de eritrócitos (RBC), hematócrito (Ht) e concentração de hemoglobina total ([Hb]). A análise estatística não demonstrou diferenças significativas no número de eritrócitos dos peixes dos diferentes tratamentos, contudo, observou-se aumento significativo após 24 e 48 h de recuperação em todos os tratamentos, retornando aos valores iniciais após 96 h (Figura 2A). O hematócrito manteve-se praticamente inalterado durante todo o período experimental, independente do tratamento (Figura 2B). Os valores médios da concentração de hemoglobina não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, entretanto, observou-se elevação após 24 e 48 h do transporte em todos os tratamentos, retornando aos níveis iniciais, após 96 h de recuperação (Figura 2C).

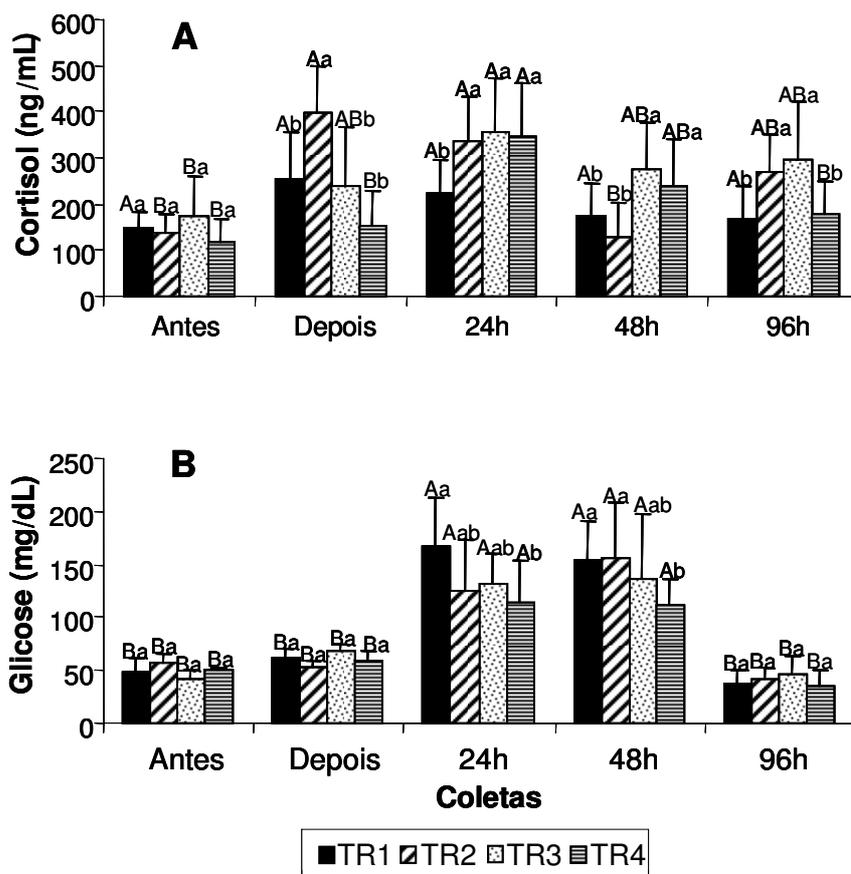


Figura 1. Valores médios de cortisol (A) e glicose (B) em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas. TR1= controle; TR2 = ração + levamisol por seis dias; TR3 = ração + levamisol por 12 dias e TR4 = ração + levamisol por 18 dias antes do transporte. Letras maiúsculas indicam diferenças nos tratamentos entre os diferentes tempos de coleta e letras minúsculas indicam diferenças entre tratamentos no mesmo tempo ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

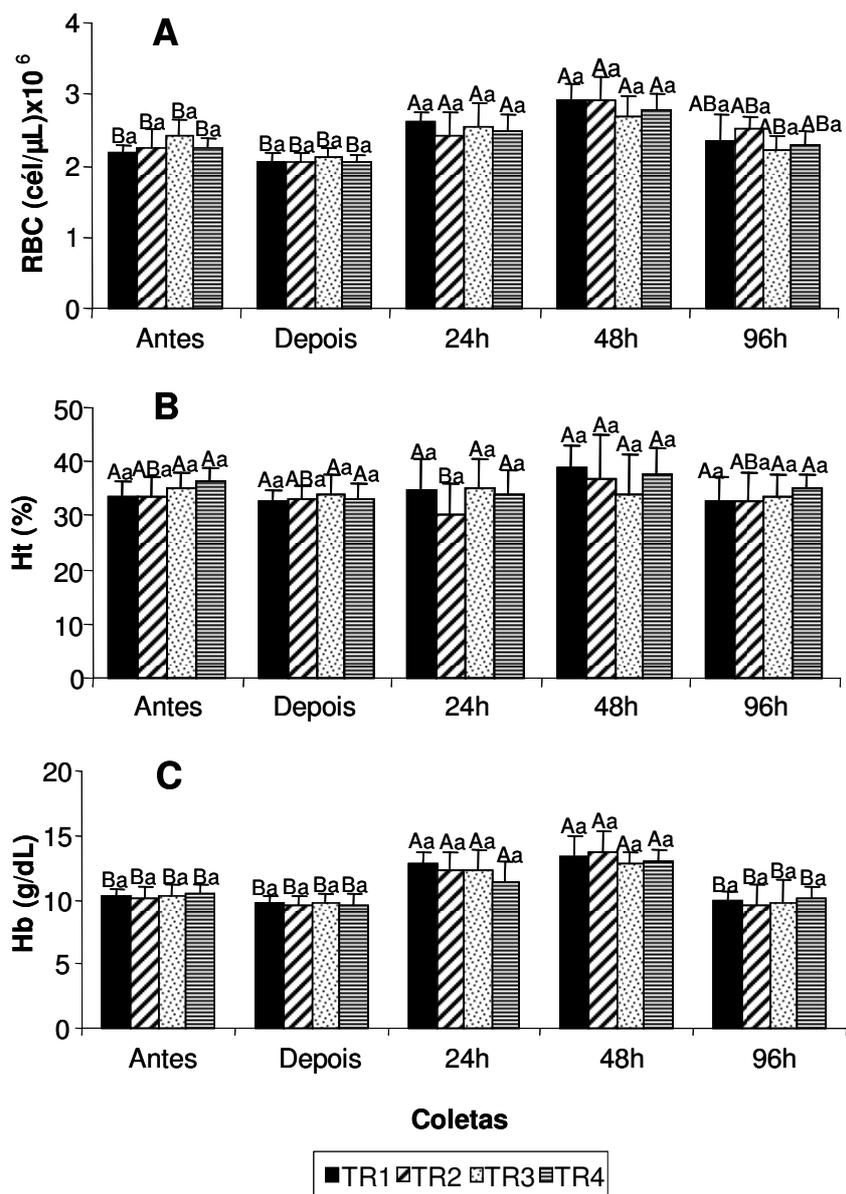


Figura 2. Valores médios de eritrócitos - RBC (A), hematócrito - Ht (B) e concentração de hemoglobina - [Hb] (C) em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas. TR1= controle; TR2 = ração + levamisol por seis dias; TR3 = ração + levamisol por 12 dias e TR4 = ração + levamisol por 18 dias antes do transporte. Letras maiúsculas indicam diferenças nos tratamentos entre os diferentes tempos de coleta e letras minúsculas indicam diferenças entre tratamentos no mesmo tempo ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

Os índices hematimétricos de Wintrobe (1934) estão representados na Figura 3. O volume corpuscular médio (VCM) apresentou declínio ($P < 0,05$) após 24 e 48 h do transporte, independente do tratamento, recuperado após 96 h (Figura 3A). A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) apresentou aumento significativo após 24 e 48 h de recuperação em TR1, TR2 e TR3, retornando aos valores iniciais após 96 h. Os peixes do tratamento TR4 não apresentaram alterações nos valores de CHCM durante todo o período experimental (Figura 3B).

Os valores médios de leucócitos (WBC) e trombócitos estão expressos na Figura 4. Diminuição significativa foi verificada na contagem dos leucócitos dos peixes de todos os tratamentos com levamisol (TR2, TR3, e TR4) imediatamente após o transporte. Esses valores retornaram e se mantiveram próximos àqueles obtidos antes do transporte durante todo o período de recuperação (Figura 4A). Da mesma forma, o número de trombócitos diminuiu significativamente imediatamente após o transporte em todos os tratamentos, retornando à condição inicial após o período de recuperação, exceto para TR3 em 96 h que apresentou valores de trombócitos superiores ($P < 0,05$) aos obtidos antes do transporte (Figura 4B).

Os valores médios de proteínas totais dos exemplares de matrinxã não foram influenciados pela suplementação de levamisol em diferentes tempos de alimentação (Figura 5). Durante todo o período experimental, os níveis de proteína foram mantidos até 48 h, com subsequente diminuição após 96 h.

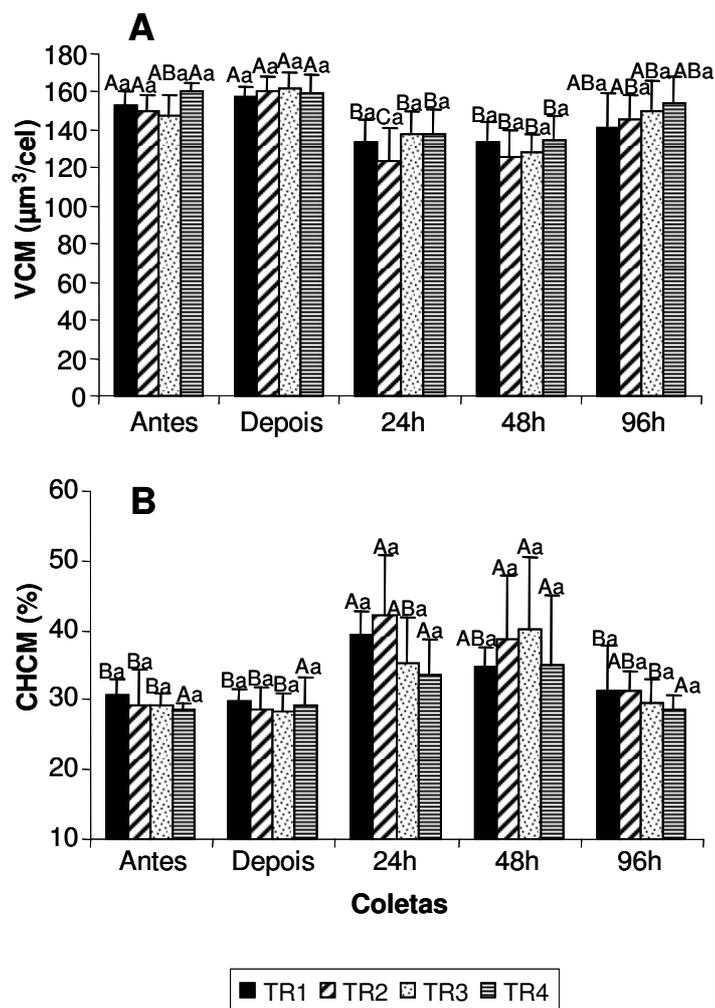


Figura 3. Volume corpuscular médio - VCM (A) e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM (B) em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas. TR1= controle; TR2= ração + levamisol por seis dias; TR3= ração + levamisol por 12 dias e TR4= ração + levamisol por 18 dias antes do transporte. Letras maiúsculas indicam diferenças nos tratamentos entre os diferentes tempos de coleta e letras minúsculas indicam diferenças entre tratamentos no mesmo tempo ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

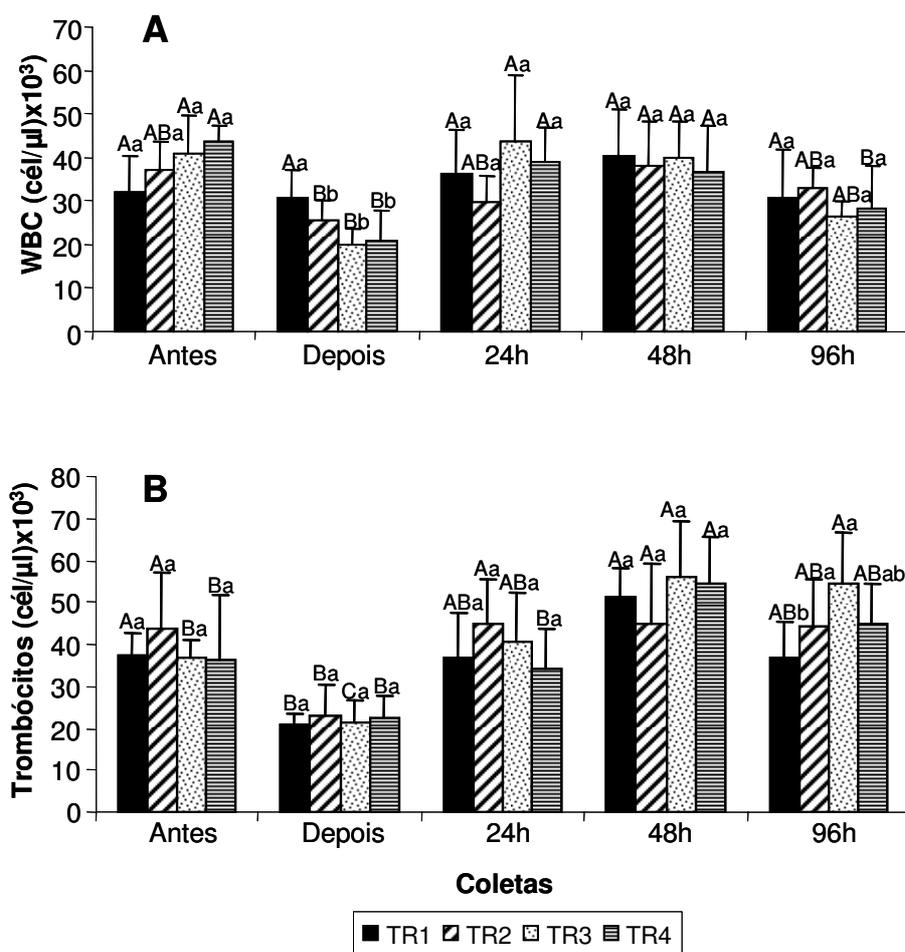


Figura 4. Valores médios de leucócitos - WBC (A) e trombócitos (B) em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas. TR1= controle; TR2= ração + levamisol por seis dias; TR3= ração + levamisol por 12 dias e TR4= ração + levamisol por 18 dias antes do transporte. Letras maiúsculas indicam diferenças nos tratamentos entre os diferentes tempos de coleta e letras minúsculas indicam diferenças entre tratamentos no mesmo tempo ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

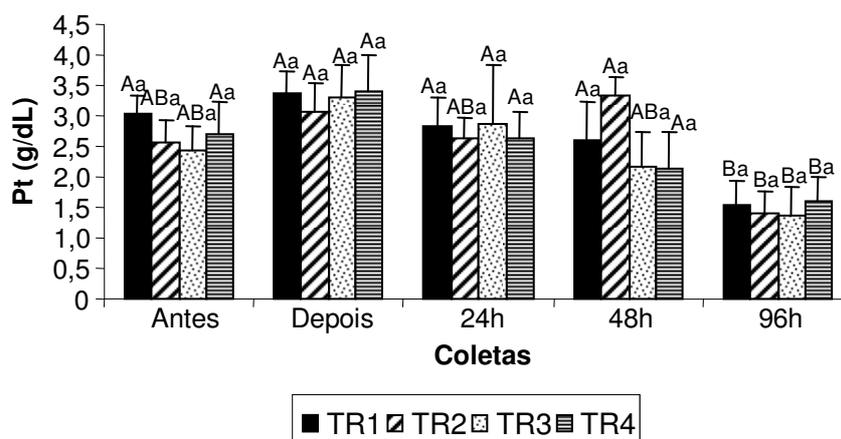


Figura 5. Valores médios de proteínas totais (Pt) em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas. TR1= controle; TR2= ração + levamisol por seis dias; TR3= ração + levamisol por 12 dias e TR4= ração + levamisol por 18 dias antes do transporte. Letras maiúsculas indicam diferenças nos tratamentos entre os diferentes tempos de coleta e letras minúsculas indicam diferenças entre tratamentos no mesmo tempo ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

Os valores médios dos íons plasmáticos (Cl^- , Na^+ e K^+) estão representados na Figura 6. Os níveis de cloreto diminuíram significativamente em 24 e 48 h de recuperação após o transporte nos tratamentos TR1, TR2, e TR3 (Figura 6A). No TR4, os níveis de cloreto, embora tenham diminuído, não foram significativamente diferentes daqueles obtidos antes e imediatamente após o transporte. Após 96 h, apenas os peixes do TR1 (controle) recuperaram os níveis de cloreto obtidos antes do transporte. Para o íon potássio, diminuição significativa foi observada após 48 h de recuperação nos peixes de todos os tratamentos, retornando às condições iniciais após 96 h (Figura 6B). As concentrações de sódio plasmático, em geral, diminuíram em 48 h de recuperação, entretanto, somente TR1 (controle) foi diferente ($P < 0,05$) em relação as demais fases do experimento, retornando aos valores iniciais em 96 h (Figura 6C).

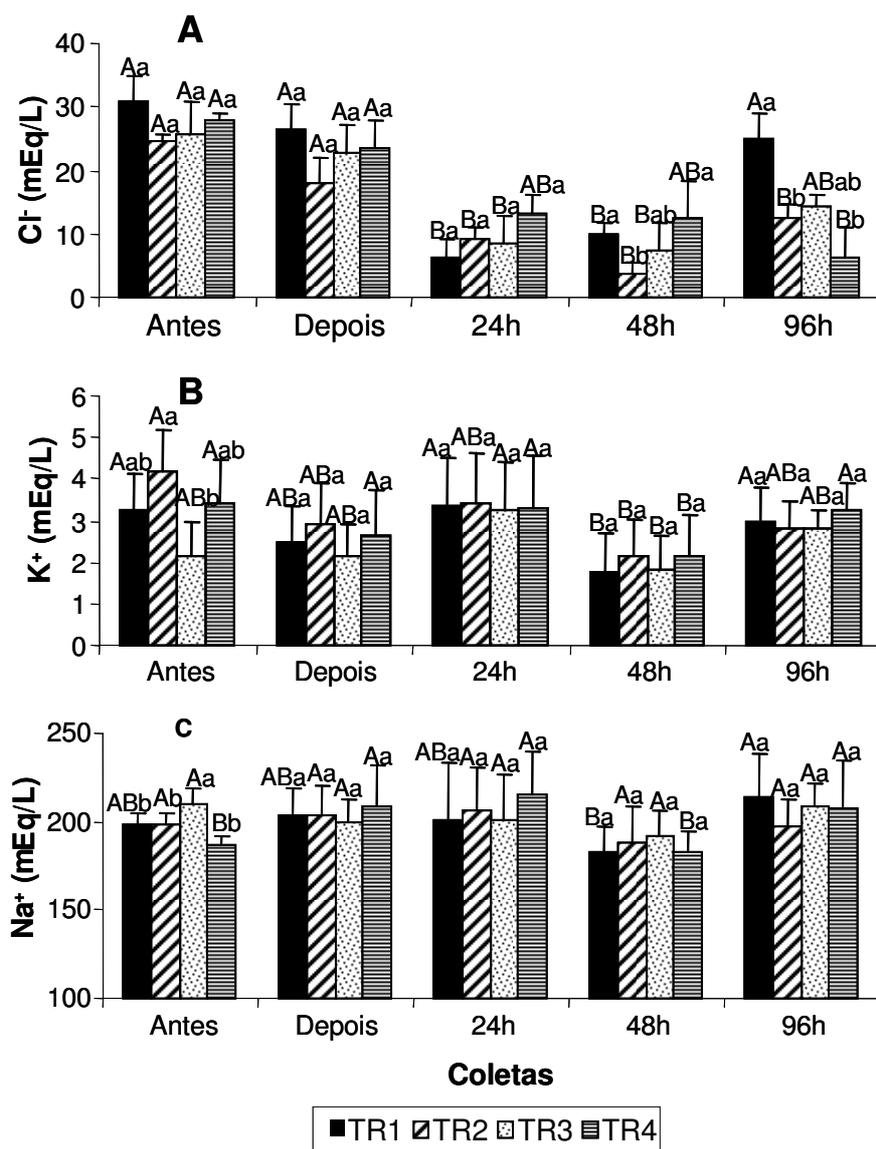


Figura 6. Valores médios de cloreto - Cl^- (A), sódio - Na^+ (B) e potássio - K^+ (C) - em matrinxãs (*B. amazonicus*) alimentados com ração suplementada com levamisol e submetidos ao transporte por cinco horas. TR1= controle; TR2= ração + levamisol por seis dias; TR3= ração + levamisol por 12 dias e TR4= ração + levamisol por 18 dias antes do transporte. Letras maiúsculas indicam diferenças nos tratamentos entre os diferentes tempos de coleta e letras minúsculas indicam diferenças entre tratamentos no mesmo tempo ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

4 DISCUSSÃO

A qualidade da água durante o transporte de peixes é um dos fatores que pode afetar o sucesso desta prática (Kubitzka, 1999). No presente estudo, os valores elevados de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) não foram suficientes para aumentar as concentrações de amônia tóxica (NH_3) durante o transporte de matrinxã, provavelmente devido ao pH, que se manteve praticamente inalterado após cinco horas (Tabela 2). Na água, a amônia pode ser encontrada na forma de íon amônio (NH_4^+) ou amônia (NH_3), sendo o pH o principal fator que determina a proporção que essas duas formas estão presentes: quanto maior o pH, maior será a porcentagem de amônia tóxica (Kubitzka, 2003). Segundo Carneiro & Urbinati (2001), essa espécie parece ser bastante tolerante ao NH_3 , podendo sobreviver à concentração de 0,70 mg/L por 24 h.

Além da concentração de amônia, os valores médios de temperatura da água de transporte de matrinxã, em todos os tratamentos, foram elevados. Embora esses valores estejam acima dos recomendados por Kubitzka (1999) para o transporte de peixes tropicais, estudos realizados por Guimarães & Storti Filho (2003) demonstraram que a faixa de tolerância à temperatura por juvenis de matrinxã está entre 18 e 36 °C. Portanto, os valores elevados de temperatura durante o transporte de matrinxã (31 a 34 °C) estão dentro dos limites tolerados por esta espécie, que teve 100% de sobrevivência durante o experimento.

Para a elaboração de programas de manejo em aquicultura, a avaliação de indicadores fisiológicos tem sido importante ferramenta para o entendimento dos processos adaptativos dos peixes (Wedemeyer, 1996). Dentre os inúmeros parâmetros comumente utilizados em estudos sobre estresse em peixes, o cortisol tem sido amplamente avaliado, pois é componente essencial da resposta primária do estresse (Carmichel et al., 1984; Barton & Iwama, 1991; Wendelaar-Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999). Sob tais condições, os níveis de cortisol aumentam e, após alguns dias, retornam aos valores iniciais, demonstrando adaptação dos animais à nova situação (Pottinger & Pickering, 1992; Tort et al., 1996). Alguns imunoestimulantes podem atuar inibindo a liberação de cortisol em peixes sob condições de estresse (Montero et al.,

1999; Ortuño et al., 2003; Herrero et al., 2006). Entretanto, Jeney et al. (1997) verificaram aumento do cortisol após o transporte da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) por duas horas, após receberem suplementação de glicano na dieta. Esses resultados corroboram aqueles descritos por Montero et al. (1999) que não encontraram efeito da suplementação dietária das vitaminas C e E na diminuição do estresse moderado em *Sparus aurata*, evidenciando o aumento de cortisol no sangue. No presente estudo, embora os níveis de cortisol tenham apresentado variações nas diferentes fases do transporte, em geral, estas foram independentes da suplementação de levamisol na dieta.

O aumento da liberação de cortisol induz as respostas secundárias do estresse, como a hiperglicemia, que ajuda a suprir o aumento da demanda energética dos peixes durante o estresse (Mazeaud et al., 1977; Jeney et al., 1997). O uso de imunostimulantes, como a vitamina C na dieta, se mostrou efetivo em manter a glicemia sob condições de estresse em peixes (Henrique et al., 1998; Ortuño et al., 2003; Okamura et al., 2007). Entretanto, Jeney et al. (1997) observaram aumento nos níveis glicêmicos após o transporte de truta arco-íris alimentada com dietas suplementadas com glicano, exceto nos animais que receberam a dose mais elevada (1% da dieta). Os resultados do presente trabalho demonstram que o levamisol, administrado por diferentes períodos, não impediu o aumento da glicemia nos peixes após 24 e 48 horas do estresse do transporte.

Os parâmetros hematológicos têm sido amplamente empregados como índice de estresse em peixes (Barton & Iwama, 1991; Svobodová et al., 1994; Affonso, 2001; Affonso et al., 2004, 2007; Tavares- Dias & Moraes, 2004; Menezes et al., 2006). A hemoconcentração pode ser uma estratégia para aumentar a capacidade de transporte do sangue sob situações de estresse que demandam mais energia (Montero et al., 1999; Trenzado et al., 2006). Entretanto, agentes estressores que podem comprometer a absorção do ferro, a malformação ou hemólise dos eritrócitos, a inibição da síntese de hemoglobina e a competição pelo sítio de ligação do oxigênio, causando hemodiluição ou anemia nos peixes e, desta forma, reduzindo a capacidade de transporte de oxigênio do sangue (Affonso, 2001; Affonso et al., 2004; Tavares-

Dias & Moraes, 2004). Dessa forma, a análise dos parâmetros hematológicos pode contribuir para avaliar o estado de saúde dos peixes.

Estes indicadores hematológicos têm sido usados, rotineiramente, em estudos que avaliam a eficiência de imunostimulantes como medida profilática em peixes (Chagas & Val, 2003; Misra et al., 2006; Affonso et al., 2007; Andrade et al., 2007; Falcon, 2007; Garcia et al., 2007). Os resultados obtidos nem sempre são positivos, pois vários fatores como, tipo de substância usada, dose e tempo de alimentação, podem influenciar nas respostas. Falcon (2007), testando a suplementação de vitamina C e glicano na dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), observou diferentes respostas hematológicas a diferentes agentes estressores, e concluiu, ainda, que o período de suplementação que antecede ao estresse interfere nessas respostas. Abreu (2007) não observou efeito da suplementação de glicano nas respostas hematológicas de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, após estresse de captura, sendo que os peixes alimentados com baixas concentrações deste imunostimulante apresentaram respostas ainda mais pronunciadas de estresse. Estes resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, cujas variações observadas nos parâmetros hematológicos foram respostas ao estresse do transporte.

Outro efeito secundário do estresse que pode ser consequência das elevações crônicas do cortisol plasmático é a imunossupressão, a qual pode levar ao aumento da suscetibilidade aos patógenos (Maule et al., 1987). Os corticosteróides podem prevenir o rápido aparecimento de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado de ratos (Chio & Sin, 1992) e de humanos (Rebuck & Crowley, 1955) e ter efeito citolítico direto sobre os linfócitos (Wiik et al., 1989). Em peixes, os níveis elevados de cortisol podem causar leucopenia sob condições de estresse (Benfey & Biron, 2000). Alguns estudos, contudo, demonstraram que a administração de levamisol pode ter efeito positivo sobre o número de leucócitos (Jeney & Anderson, 1993; Safi et al., 2006). Entretanto, os resultados do número de leucócitos para matrinxãs alimentados por diferentes períodos com rações suplementadas com levamisol demonstram que este imunostimulante não influenciou na liberação destas

células e que, provavelmente, o cortisol contribua para a leucopenia durante o estresse do transporte.

Nos vertebrados não mamíferos, incluindo peixes, a principal função dos trombócitos está relacionada com a coagulação sangüínea. No entanto, estas células apresentam ainda diversas funções, estando envolvidas na liberação de produtos relacionados à agregação de trombócitos e com a inflamação (Lloyd-Evans et al., 1994; Tavares-Dias & Moraes, 2004), participando também na defesa imune (Kollner et al., 2004; Tavares-Dias & Moraes, 2004; Bozzo et al., 2007). Menezes et al. (2006) descrevem a importância da suplementação de vitamina C na dieta de pirarucu (*A. gigas*) para a estimulação dos leucócitos e trombócitos. Segundo esses autores, a adição de superdoses de vitamina E, ao contrário, não aumentou a produção dessas células no pirarucu criado em tanque-rede. Semelhante aos leucócitos, o número de trombócitos no matrinxã não foi influenciado pela suplementação do levamisol na dieta, cujos resultados demonstram resposta negativa ao estresse de transporte. Alguns autores tentam também associar a diminuição dessas células com o cortisol. A diminuição no número de trombócitos em peixes foi verificada em *Salmo trutta* sob efeito de um estressor (Pickering & Pottinger, 1989) e para *Salmo salar*, após administração de cortisol na dieta (Wiik et al., 1989). Para matrinxã sob efeito do estresse do transporte, o número de trombócitos circulantes, assim como os de leucócitos, demonstra relação com as variações nas concentrações de cortisol, sugerindo o efeito deste hormônio sobre a porcentagem destas células.

O teor de proteínas totais plasmáticas é também utilizado como importante indicador das respostas imunes não específicas em peixes alimentados com dietas suplementadas com imunoestimulantes (Jeney et al., 1997; Sealey & Gatlin III, 2002; Kumari & Sahoo, 2006; Affonso et al., 2007; Andrade et al., 2007; Sahu et al., 2007). Estudos realizados com diferentes imunoestimulantes têm mostrado o efeito destas substâncias sobre a síntese de proteínas totais em peixes com e sem exposição a um agente estressor (Jeney et al., 1997; Menezes et al., 2006; Affonso et al., 2007). No entanto, nesse estudo, o levamisol não influenciou a síntese de proteínas totais plasmáticas no matrinxã durante as diferentes etapas do experimento. Estes

resultados são corroborados com aqueles obtidos para *Clarias batrachus* (Kumari & Sahoo, 2006) e *Labeo rohita* (Sahoo & Mukherjee, 2002), que não apresentaram variações nos níveis de proteínas totais após exposição ao levamisol.

O aumento nos níveis circulantes de cortisol e catecolaminas, decorrentes do estresse de transporte, pode causar desequilíbrio eletrolítico nos peixes (Mc Donald e Milligan, 1997). Isso ocorre porque, em condições de estresse, os níveis elevados desses hormônios podem aumentar o fluxo sanguíneo e a permeabilidade das células branquiais, e, conseqüentemente, a perda de íons para o meio (Carneiro & Urbinati, 2001). Diferente dos animais do controle, os níveis de cloreto nos tratamentos com levamisol mantiveram-se baixos após 96 h de recuperação, demonstrando efeito negativo deste imunestimulante na regulação iônica do matrinxã. Os níveis de potássio e sódio, contudo, mantiveram-se praticamente constantes ao longo do experimento. Segundo Carmichel et al. (1983) e Carneiro & Urbinati (2001), os níveis de potássio circulante podem não oscilar com o estresse, contudo, pode-se observar aumento nos valores desse cátion provocado pelo aumento da fragilidade das células.

Os imunestimulantes, embora tenham influência positiva no sistema imune de diversas espécies de peixes, apresentam resultados distintos como redutores dos efeitos do estresse. De acordo com Jeney et al. (1997) e Volpatti et al. (1998), a alimentação com baixas doses de glicano (1% da dieta) durante diversas semanas antes do transporte pode ter efeito positivo na prevenção dos efeitos negativos causados por essa prática. No entanto, Abreu (2007) concluiu que o glicano administrado na ração não foi capaz de minimizar as alterações causadas pelo estresse de captura no pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Diversos autores também reportaram os efeitos benéficos da vitamina C (ácido ascórbico). Segundo Verlhac & Gabaudan (1994), o aumento da disponibilidade de ácido ascórbico pode prevenir a severidade da resposta ao estresse em peixes. Lim et al. (2002) também relataram os efeitos positivos da suplementação da vitamina C na dieta do *guppy*, *Poecilia reticulata*, aumentando a resistência ao estresse do transporte.

A variação dos resultados obtidos a respeito dos efeitos positivos de cada imunostimulante pode ser explicada pelas diferenças no modo de ação de cada substância e pelos diferentes métodos de administração, além da idade dos peixes, seu estado fisiológico, ou mesmo variações inter-específicas (Mulero et al., 1998). Dessa maneira, a determinação da dose de levamisol que seja efetiva para o matrinxã é igualmente importante à determinação do tempo de suplementação que tenha efeito protetor contra agentes estressores, como o transporte.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a suplementação do levamisol na concentração testada não foi eficiente na diminuição das respostas aos estímulos causados pelo transporte no matrinxã. Porém, para se obter resultados mais conclusivos a respeito dos efeitos do levamisol para esta espécie, sugere-se que outros níveis de suplementação possam ser testados, além da administração por períodos mais longos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, J.S. 2007. *Suplementação alimentar de pacu (Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 123pp.
- Affonso, E.G. 2001. Respiratory characteristics of *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). *Acta Amazônica*, 31(2): 249-262.
- Affonso, E.G.; Polez, V.L.P.; Mazon, A.F.; Araújo, M.R.R.; Moraes, G.; Rantin, F.T. 2004. Physiological responses to sulfide toxicity by the air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 139: 251-257.
- Affonso, E.G.; Silva, E.C.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Carvalho, C.S.M.; Nunus, E.S.S.; Ituassu, D.R.; Roubach, R.; Ono, E.A.; Fim, J.D.I.; Marcon, J.L. 2007. Effect of high levels of vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, 147: 383-388.
- Anderson, P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2:281-307.
- Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Menezes, G.C.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, 146: 576–580.
- Arana, L. V. 1997. *Princípios químicos de qualidade de água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões*. UFSC, Florianópolis. 166pp.

- Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 517-525.
- Barton, B.A.; Peter, R.E. 1982. Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anesthesia and cold shock. *Journal of Fish Biology*, 20: 39-51.
- Barton, B.A.; Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- Bendack, F. 2004. *Uso de sulfato de cálcio como redutor de estresse no transporte de matrinxã (Brycon cephalus)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 46pp.
- Benfey, T.; Biron, M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.
- Boyd, E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn University, Auburn, Alabama, EUA. 183pp.
- Bozzo, F.R.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R.; Pereira, G.T.; Tavares-Dias, M.; Onaka, M. 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2):302-308.
- Carmichel, G.J.; Wedemeyer, G.A.; McCraen, J.D.; Millard, J.L. 1983. Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *Progress in Fish Culture*, 45: 110-113.

- Carmichel, G.J.; Tomasso, J.R.; Simco, B.A.; Davis, K.B. 1984. Characterization and alleviation of stress associated with hauling largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113:778-785.
- Carneiro, P.C.F.; Urbinati, E.C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquaculture Research*, 32: 297-304.
- Carneiro, P.C.F.; Urbinati, E.C. 2002. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei; Characidae), at different densities, *Aquaculture International*, 10: 221–229.
- Chagas, E.C.; Val, A.L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(3): 397-402.
- Chio, S.L.; Sin, Y.M. 1992. Changes in corticosterone levels under different degrees of acute inflammation in mice. *Agents and Actions*, 36:93-98.
- Chrousos, G.P. 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptative response. *Annual New York Academy of Science*, 851:311-335.
- Falcon, D.R. 2007. *β-glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 146pp.
- Garcia, F.; Pilarski, F.; Onaka, E.M.; Moraes, F.R.; Martins, M.L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 271: 39–46.

- Geets, A.; Liewes, E.W.; Ollivier, F. 1992. Efficacy of some anthelmintics against the swimbladders nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13: 123-128.
- Gomes, L.C.; Urbinati, E.C. 2005. Matrinxã (*Brycon cephalus*). In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, p. 149-174.
- Gomes, L.C.; Araújo-Lima, C.A.R.; Chippari-Gomes, A.R.; Roubach, R. 2006. Transportation of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a closed system. *Brazilian Journal of Biology*, 66(2A): 493-502.
- Gopalakannan, A.; Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255(1-4): 179-187.
- Grøttum, J.A.; Staurnes, M.; Sigholt, T. 1997. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities, during transport. *Aquaculture Research*, 28: 159-164.
- Guimarães, S.F.; Storti Filho, A. 2003. Preliminary observations on the effect of sudden changes of temperature on survival of young matrinxã (*Brycon cephalus*) under laboratory conditions. *Acta Amazonica*, 33(4): 719-722.
- Hardie, L.J.; Fletcher, T.C.; Secombes, C.J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95: 201-214.

- Henrique, M.M.F.; Gomes, A.E.F.; Gouillou-Coustans, M.F.; Oliva-Teles, A.; Davies, S.J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161: 415–426.
- Herrero, M.J.; Martinez, F.J.; Míguez, J.M.; Madrid, J.A. 2006. Response of plasma and gastrointestinal melatonin, plasma cortisol and activity rhythms of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to dietary supplementation with tryptofan and melatonin. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 7(3):319-326.
- Inoue, L.A.K.A.; Santos-Neto, C.; Moraes, G. 2003. Clove oil as anesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, 33(5): 943-947.
- Inoue, L.A.K.A. 2005. *Respostas do matrinxã (Brycon cephalus) a anestésicos e estressores*. 2005. Dissertação de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 148pp.
- Ispir, U.; Yonar, M.E. 2007. Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). *Acta Veterinaria Brno*, 76: 493-497.
- Izel, A.C.U.; Melo, L.A.S. 2003. *Criação de matrinxã (Brycon amazonicus) em barragens no Estado do Amazonas*. Comunicado Técnico 20 – Embrapa Publicações. Manaus, Amazonas. 2 p.
- Jeney, G.; Anderson, D.P. 1993. 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*, 116: 315–329.

- Jeney, G.; Galeotti, M.; Volpatti, D. 1994. *Effect of immunostimulation on the non specific immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax**. In: International Symposium on Aquatic Animal Health: Program and Abstracts, Seattle, Washington, USA , p. 4–8.
- Jeney, G.; Galeotti, M.; Volpatti, D.; Jeney, Z.; Anderson, D. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154: 1-15.
- Kollner, B.; Fischer, U.; Rombout, J.H.W.M.; Taverne-Thiele, J.J.; Hansen, J.D. 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Developmental of Comparative Immunology*, 28:1049-1062.
- Kubitza, F. 1999. *Técnicas de transporte de peixes vivos*. Fernando Kubitza, Jundiaí, São Paulo. 51pp.
- Kubitza, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. Fernando Kubitza, Jundiaí, São Paulo. 229pp.
- Kumari, J.; Sahoo, P. 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 37: 500-509.
- Lim, L.C.; Dhert, P.; Chew, W.Y.; Dermaux, V.; Nelis, H.; Sorgeloos, P. 2002. Enhancement of stress resistance of guppy *Poecilia reticulata* through feeding with vitamin C. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(1): 32-40.
- Lim, L.C.; Dhert, P.; Sorgeloos, P. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research*, 34(11): 923-935.

- Lima, F.C.T. 2003. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Orgs). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDPURCS, Porto Alegre. p. 174-181.
- Lloyd-Evans, P.; Barrow, S.E.; Hill, D.J.; Bowden, L.A.; Rainger, G.E.; Knight, J.; Rowley, A.F. 1994. Eicosanoid generations and effects on the aggregation of thrombocytes from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochimica and Biophysica Acta*, 1251:291-299.
- Maule, A.G.; Schreck, C.B.; Kaattari, S.L. 1987. Changes in the immune system of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr-to-smolt transformation and after implantation of cortisol. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44: 161-166.
- Mazeaud, M.; Mazeaud, F.; Donaldson, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- McDonald, G.; Milligan, L. 1997. 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, Cambridge. p. 119–144.
- 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. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 145(2): 274-279.
- Misra, C.K.; Das, B.K.; Mukherjee, S.C.; Pattnaik, P. 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255: 82-84.

- Mommsen, T.P.; Vijayan, M.M.; Moon, T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211–268.
- Montero, D.; Marrero, M.; Izquierdo, M.S.; Robaina, L.; Vergara, J.M.; Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus auratus*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.
- Mulero, V.; Esteban, M.A.; Munoz, J.; Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 49-62.
- Munday, B.L.; Zilberg, D. 2003. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(1): 3-6.
- Okamura, D.; Araújo, F.G.; Logato, P.V.R.; Murgas, L.D.S.; Freitas, R.T.F.; Araújo, R.V. 2007. Efeito da vitamina C sobre o hematócrito e glicemia de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em transporte simulado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(4): 883-888.
- Ortuño, J.; Esteban, J.; Meseguer, M.A. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 14:145–156.
- Pickering, A.D.; Pottinger, T.G. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1-60):253-258.

- Pottinger, T.G.; Pickering, A.D. 1992. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *Journal of Fish Biology*, 41: 435–447.
- Purzyc, L.; Calkosinski, I. 1998. Ecto ATPase from rat lymphocytes – in vivo studies on the influence of levamisole. *Polish Journal of Pharmacology*, 50: 239-251.
- Rebuck, J.W.; Crowley, J.H. 1955. A method of studying leukocytic functions in vivo. *Annual New York Academy of Sciences*, 59: 757.
- Robertson, L.; Thomas, P.; Arnold, C.R.; Trant, J.M. 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Progress in fish Culture*, 49: 1-12.
- Safi, S.; Roodsari, H.V.; Ahmadi, M.R. 2006. The effect of levamisole hydrochloride on survival of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fry. *Journal of Applied Ichthyology*, 22 (1): 226-230.
- Sahoo, P.K.; Mukherjee, S.C. 2002. The effect of immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 1-16.
- Sahu, S.; Das, B.K.; Mishra, B.K.; Pradhan, J.; Saragi, N. 2007. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 80-86.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.

- Sealey, W.M.; Gatlin III, D.M. 2002. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) but have limited effects on immune responses. *Nutrient Interact and Toxicology*, 748-755.
- Svobodová, Z.; Vykusová, B.; Máchová, J. 1994. The effect of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. In: Müller, R.; Lloyd, R. (Eds). *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. FAO - Fishing News Books, Cambridge, p. 39-52.
- Tavares-Dias, M.; Melo, J.F.B.; Moraes, G.; Moraes, F.R. 2002. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Ramdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, 32(4): 693-698.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, 19: 103-110.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. M. Tavares-Dias, Ribeirão Preto, São Paulo.144pp.
- Tort, L.; Sunyer, J.O.; Gomez, E.; Molinero, A. 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51(1-2): 179-188.
- Trenzado, C.E.; Morales, A.E.; la Higuera, M. 2006. Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness, *Aquaculture*, 258: 583-593.

- Urbinati, E.C.; Abreu, J.S.; Camargo, A.C.S.; Landines, M.A.P. 2004. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, 229: 389-400.
- Urbinati, E.C.; Carneiro, P.C.F. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Editora TechArt, São Paulo. p. 171-194.
- Verlhac, V.; Gabaudan, J.F. 1994. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 21-36.
- Verdouw, H.; Van Eched, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*, 12(6): 397-402.
- Volpatti, D.; D'angelo, L.; Jeney, G.; Jeney, Z.; Anderson, D.P.; Galeotti, M. 1998. Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3-4): 201-206.
- Wedemeyer, G.A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman & Hall, Nova York. 232pp.
- Wedemeyer, G.A.; McLeay, D.J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Pickering A.D. (Ed). *Stress and fish*. Academic Press, p. 247-275.
- Wendelaar-Bonga, S.E.W. 1997. The stress response in fish. *Physiology Review*, 77:591-625.

Wiik, E.; Andersen, K.; Uglenes, I.; Egidius, E. 1989. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with the effects on the blood cell patterns. *Aquaculture*, 83: 201-215.

Wintrobe, M.M. 1934. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematology*, 51: 32-49.

CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

Neste trabalho, a suplementação de levamisol na dieta do matrinxã durante 45 dias em condições experimentais não proporcionou melhor desempenho zootécnico nos animais, embora os resultados apresentados tenham sido satisfatórios para a produção do matrinxã. Contudo, é provável que ausência de efeito significativo sobre o desempenho produtivo, observada neste estudo, esteja relacionada à boa qualidade das condições experimentais. Possivelmente, o efeito benéfico do levamisol como promotor de crescimento em peixes, observado em alguns estudos, possa estar relacionado ao aumento da resposta imune e à manutenção da homeostase do organismo, possibilitando, dessa maneira, maior consumo da dieta com conseqüente aumento no ganho de peso.

Dessa maneira, sugere-se a condução de novos trabalhos, em condições de cultivo, avaliando-se o desempenho dos peixes frente às condições adversas presentes neste sistema, como altas densidades de estocagem, variações nos parâmetros físico-químicos da água, suscetibilidade à infestação de parasitas, entre outras.

Nessas mesmas condições experimentais, observou-se que a suplementação com 100 e 300 mg de levamisol/kg na ração proporcionou estado fisiológico adequado para o matrinxã, promovendo melhores condições para o transporte de oxigênio e estimulação do sistema imune não-específico. Entretanto, a suplementação com levamisol não foi capaz de minimizar os efeitos negativos causados pela infecção por *Aeromonas hydrophila*, nos quais as respostas dos peixes suplementados com o imunoestimulante não foram diferentes das evidenciadas pelos animais do grupo controle. Contudo, a fim de se obter resultados conclusivos sobre o efeito do levamisol como imunoestimulante para o matrinxã, além da condução de experimentos no campo, são necessários ainda novos testes para avaliar diferentes períodos de suplementação, além da avaliação de outras respostas imunes não-específicas como concentração e atividade de lisozimas e atividade respiratória de leucócitos.

Os efeitos do estresse observados após o transporte nos peixes dos tratamentos com e sem suplementação de levamisol demonstraram a capacidade

adaptativa dessa espécie em recuperar a homeostase fisiológica, sendo os períodos mais críticos as primeiras 24 h após o transporte. Entretanto, a suplementação com levamisol, por diferentes períodos que antecederam o transporte, não foi eficiente em minimizar as respostas de estresse evidenciadas pelo matrinxã após essa prática. Independente da suplementação de levamisol na dieta, os níveis de cortisol apresentaram variações nas diferentes fases de transporte, sendo este associado à diminuição no número de leucócitos e trombócitos circulantes.

Dentro das condições do presente trabalho, evidencia-se a necessidade de mais estudos a respeito das concentrações de levamisol a serem testadas, assim como períodos e métodos de suplementação, especialmente em condições de cultivo, a fim de se concluir sobre os efeitos do levamisol para o matrinxã.