

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Perfil farmacocinético do levamisol e eficácia do uso de imunoestimulantes  
dietéticos em juvenis de surubim *Pseudoplatystoma* sp**

**Ricardo Basso Zanon**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e  
Pastagens

**Piracicaba  
2013**

Ricardo Basso Zanon  
Farmacêutico Industrial

**Perfil farmacocinético do levamisol e eficácia do uso de imunoestimulantes dietéticos em juvenis de surubim *Pseudoplatystoma* sp.**  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba  
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Zanon, Ricardo Basso

Perfil farmacocinético do levamisol e eficácia do uso de imunostimulantes dietéticos em juvenis de surubim *Pseudoplatystoma* sp / Ricardo Basso Zanon. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

118 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Moduladores imunológicos 2. Aditivos alimentares 3. Alimentação animal  
4. Dietética 5. Peixes de água doce 6. Vitamina E I. Título

CDD 639.375  
Z33p

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

**DEDICATÓRIA**

**À minha família,  
DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino, por ter acreditado, confiado e apostado em mim. Pelas constantes contribuições, orientações e ensinamentos neste período. Tive a oportunidade de conviver e trabalhar com um profissional que é um exemplo a ser seguido;

À minha família, representada especialmente por Edeimar e Lenir Zanon; Renato, Priscila e pela pequena princesa Isabela Zanon e, também, Regina e Guilherme, pela constante fé, força, confiança e incentivo;

À Tarcila Souza de Castro da Silva, amor da minha vida, pelo companheirismo, carinho e constantes ensinamentos;

Aos mais do que amigos Nilvo, Daniel, Paulo e Fábio Basso;

Ao Manoel, Rosa Maria, Emílio e Tatiana;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens, em especial aos Professores Raul Machado Neto, Eduardo Francisquine Delgado, Roberto Sartori Filho, Valdomiro Shigueru Miyada, Sila Carneiro da Silva;

Ao Professor Gerson Barreto Mourão pelas importantíssimas contribuições;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens pela oportunidade de realizar o curso;

À FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro fornecido através de bolsas de estudos;

Ao amigo e colega Brunno da Sila Cerozzi, que esteve sempre engajado no desenvolvimento não só dos projetos propostos, mas em todos os momentos envolvidos em minha passagem pela ESALQ, sempre. Amigo é aquele com quem podemos contar;

Aos amigos e colegas Prof. Dr. Álvaro Bicudo, Prof. Dr. Ricardo Sado e Dra. Lígia Uribe Gonçalves pelos conselhos e direcionamentos;

Aos colegas de laboratório Thyssia B. A. Silva, Giovanni V. Moro, Jony K. Dairiki, Ricardo Borghesi, Renan G. Donadelli, Núbio V. Gomes da Silva, Mateus N. Narazaki, Fábio B. Ribeiro, Thiago A. Freato, Roselany O. Corrêa, Fernando Y. Yamamoto e Roberta A. Moura, pelo convívio e pelo auxílio no desenvolvimento dos projetos de pesquisa;

Aos amigos Priscila Vilella, Naiane Sangaleti, Ana Paulo Nascimento, Erika Cavalcante, Ana Luíza Costa, Alexandra, Leandro Costa, Jacqueline Lima, Louise Oliveira,

Wiolene Montanari, Janaína R. Lima e, em especial, aos “irmãos” Bruno F. De Conti, Augusto C. Lima e Anderson Ferreira;

Aos técnicos do Setor de Piscicultura Sérgio V. Pena e Ismael B. Junior;

À Professora Dra. Elisabeth Urbinati e à Dra. Jaqueline Biller (CAUNESP) pelos ensinamentos e disponibilização dos laboratórios;

À Prof. Dra. Simone P. Lira e demais pessoas do Laboratório de Química da USP-ESALQ pela disponibilização do laboratório;

Ao Professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho e sua equipe;

Ao Professor Dr. Dominique P. Bureau pela recepção em seu laboratório na University of Guelph (Canadá);

À guarda universitária da USP-ESALQ pelo serviço prestado, vigiando as instalações, nos contatando e nos acompanhando nas inúmeras vezes que tivemos problemas de eletricidade no Setor de Piscicultura;

A todos que de maneira direta ou indireta me ajudaram na realização deste trabalho:

Muito obrigado!!!

*“Têm coisas que tem seu valor  
Avaliado em quilates, em cifras e fins  
E outras não têm o apreço  
Nem pagam o preço que valem pra mim...”*

**Gujo Teixeira**





## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	19
1.1 Sistema imunológico em peixes .....	21
1.2 Nutrição e imunidade .....	24
1.3 Imunoestimulantes .....	26
1.4 Levamisol .....	29
1.5 Vitamina E .....	36
1.6 O surubim <i>Pseudoplatystoma</i> sp. ....	45
Referências .....	46
2 FARMACOCINÉTICA DO LEVAMISOL EM PINTADO <i>PSEUDOPLATYSTOMA</i> <i>CORRUSCANS</i> .....	59
Resumo .....	59
Abstract .....	59
2.1 Introdução .....	59
2.2 Material e métodos .....	61
2.2.1 Espécie modelo utilizada e condições experimentais .....	61
2.2.2 Estudo farmacocinético .....	61
2.2.3 Reagentes químicos e procedimentos analíticos .....	61
2.2.4 Análises estatísticas e parâmetros farmacocinéticos .....	62
2.3 Resultados e discussão .....	63
2.4 Conclusões .....	68
Referências .....	69
3 LEVAMISOL DIETÉTICO COMO IMUNOESTIMULANTE PARA O CACHARA <i>PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM</i> .....	73
Resumo .....	73
Abstract .....	73
3.1 Introdução .....	73
3.2 Material e métodos .....	76
3.2.1 Peixes e condições experimentais .....	76
3.2.2 Dieta experimental .....	76
3.2.3 Avaliação das variáveis de desempenho .....	77
3.2.4 Respostas imunológicas .....	77
3.2.5 Análises estatísticas .....	80
3.3 Resultados e discussão .....	80

3.3.1 Variáveis de desempenho.....	82
3.3.2 Variáveis imunológicas.....	84
3.4 Considerações finais .....	87
Referências.....	89
4 VITAMINA E COMO IMUNOESTIMULANTE PARA CACHARA <i>PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM</i> .....	93
Resumo .....	93
Abstract .....	93
4.1 Introdução .....	93
4.2 Material e Métodos .....	95
4.2.1 Aceitabilidade da dieta semi-purificada à base de farinha de peixe desengordurada.....	96
4.2.2 Vitamina E dietética como imunomodoladora.....	97
4.2.3 Quantificação da vitamina E no fígado e músculo dos peixes.....	98
4.2.4 Respostas imunológicas .....	99
4.2.5 Análises estatísticas.....	101
4.3 Resultados e discussão.....	101
4.3.1 Aceitabilidade de dieta semi-purificada preparada a base de farinha de peixe desengordurada .....	101
4.3.2 Desempenho e análises histológicas .....	102
4.3.3 Variáveis imunológicas.....	109
4.4 Considerações finais .....	111
Referências.....	112

## RESUMO

### **Perfil farmacocinético do levamisol e eficácia do uso de imunostimulantes dietéticos em juvenis de surubim *Pseudoplatystoma* sp**

Tendo em vista o notável crescimento da aquicultura mundial e principalmente a brasileira, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de tecnologias que favoreçam esta prática. No entanto, a intensificação da piscicultura faz aumentar as chances de ocorrência de epizootias nos sistemas de produção como resultado do maior estresse imposto aos animais (lotação, manejo, transporte etc). Este estudo determinou a eficácia na utilização de imunostimulantes dietéticos (levamisol e vitamina E) e a farmacocinética do imunostimulante levamisol em juvenis de surubim *Pseudoplatystoma* sp. O levamisol dietético não afetou as variáveis de desempenho, mas influenciou positivamente o sistema imunológico inespecífico do cachara, afetando a atividade da lisozima sérica, sendo o melhor resultado observado para a concentração de levamisol de 247 mg kg<sup>-1</sup> de ração. No estudo com vitamina E, não foram registrados efeitos sobre as variáveis de desempenho; ainda, na dose dietética 166 mg kg<sup>-1</sup> o acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol promoveu aumento das globulinas séricas. O estudo farmacocinético revelou-se que o levamisol é eliminado do sangue do cachara em 12 horas, sendo a meia-vida de distribuição ( $t_{1/2\alpha}$ ) de 0,10 horas, e para o intervalo de eliminação meia-vida ( $t_{1/2\beta}$ ) de 1,86 horas.

Palavras-chave: Farmacocinética; Imunostimulantes; Levamisol; Vitamina E;  
*Pseudoplatystoma*



## ABSTRACT

### **Pharmacokinetic study and efficiency of dietary immunostimulants in juvenile of *Pseudoplatystoma* sp.**

Continuous stress negatively influences the immune system of farmed fish, increasing diseases susceptibility. In such a context, preventive measures, such as the administration of immunostimulants, are better suited for diseases control than using drugs and chemicals as remedies. This study aimed to evaluate the effects of dietary immunostimulants (levamisole and vitamin E) as well as the pharmacokinetic study of levamisole in juvenile of *Pseudoplatystoma* sp. Dietary levamisole did not affect growth parameters. However, increased lysozyme activity and lysozyme concentration, the best effects were recorded for fish fed 247 mg levamisole per kg of feed. In the vitamin E assay, no differences in growth parameters were recorded. However, vitamin E levels positively influenced the innate immune system increasing serum globulins at dose of 166 mg kg<sup>-1</sup> of DL- $\alpha$ -tocopherol acetate. Also, at pharmacokinetic study levamisole is shown to be completely eliminated from fish blood on a 12-h period, being the distribution half-life ( $t_{1/2\alpha}$ ) of 0.10 hours, whilst for the elimination interval the half-life ( $t_{1/2\beta}$ ) was 1.86 hours.

Keywords: Pharmacokinetic; Immunostimulants; Levamisole; Vitamin E; *Pseudoplatystoma*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do levamisol .....	30
Figura 2 -	Estrutura química da vitamina E (tocoferol) e seus principais isômeros. Os tocotrienóis possuem dupla-ligações nas posições C3', C7'e/ou C11' .....	37
Figura 3 -	Processo de auto-oxidação dos ácidos graxos .....	39
Figura 4 -	Regeneração do tocoferol sob influência da enzima glutathione peroxidase e vitamina C .....	40
Figura 5 -	Representação artística de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> , reproduzido de Britski; Silimon; Lopes (2007) .....	45
Figura 6 -	Escala semi-logarítmica e linear (acima e abaixo, respectivamente) representando a média $\pm$ DP da concentração plasmática do levamisol nos tempos selecionados, em pintado <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> após administração intramuscular de 50 mg de levamisol .....	64
Figura 7 -	Curva de calibração da lisozima .....	85
Figura 8 -	Concentração da lisozima sérica de cacharas alimentados com níveis de levamisol na ração ( $\mu \pm$ DP) .....	86
Figura 9 -	Consumo das diferentes dietas pelo <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> .....	102
Figura 10 -	Fotomicrografia do fígado de cachara alimentado com dieta com níveis de vitamina E; HP (hepatopâncreas), DB (ducto biliar), CS (canal sinusóide) e HE (hepatócitos). Objetiva de 10 vezes (A) e 40 vezes (B) .....	106
Figura 11 -	Concentração de vitamina E determinada no fígado e músculo de cacharas alimentados com dietas com níveis de vitamina E .....	107
Figura 12 -	Concentração de globulinas totais séricas em cacharas alimentados com níveis de vitamina E na ração ( $\mu \pm$ DP) .....	109
Figura 13 -	Curva de calibração da lisozima .....	110





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação das características do uso da quimioterapêutica, vacinas e imunostimulantes em peixes .....	27
Tabela 2 -	Estudos avaliando a atividade do levamisol em peixes (continua).....	32
Tabela 3-	Potencial biológico dos compostos com atividade de vitamina E em relação ao d- $\alpha$ -tocoferol .....	38
Tabela 4 -	Dose ideal de vitamina E para o desempenho de várias espécies de peixes.....	44
Tabela 5 -	Concentração plasmática do levamisol em pintado <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> em cada tempo de coleta, após administração única intramuscular, a 27 °C (média $\pm$ DP; n = 3) .....	63
Tabela 6 -	Parâmetros farmacocinéticos do levamisol em pintado determinados após administração intramuscular de 50 mg de levamisol kg <sup>-1</sup> de peso vivo .....	65
Tabela 7 -	Composição da dieta basal (controle).....	77
Tabela 8 -	Variáveis de desempenho do cachara após 60 dias com uso de níveis de levamisol (média $\pm$ DP) .....	81
Tabela 9 -	Variáveis imunológicas do cachara após 60 dias de alimentação com níveis de levamisol(média $\pm$ DP). .....	81
Tabela 10 -	Atividade imunostimulatória do levamisol dietético em peixes .....	83
Tabela 11 -	Composição química das farinhas de peixe original e desengordurada .....	96
Tabela 12 -	Composição das dietas experimentais para teste de aceitabilidade de farinha de peixe desengordurada.....	97
Tabela 13 -	Efeito de vitamina E dietética nas variáveis de desempenho para o cachara (média $\pm$ DP).....	104
Tabela 14 -	Efeito da vitamina E dietética nas variáveis imunológicas para o cachara (média $\pm$ DP).....	104
Tabela 15 -	Concentração de $\alpha$ -tocoferol no fígado e músculo para o cachara e outras espécies .....	108



## 1 INTRODUÇÃO

A contribuição da aquicultura para a produção mundial e brasileira de pescado tem experimentado aumentos constantes, tanto em relação à produção de peixes marinhos como de água doce, como um resultado do aumento da demanda. Este fato obrigou o desenvolvimento da indústria de pescado e a intensificação da piscicultura (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008; FAO, 2010).

A perspectiva para os próximos 30 anos é a intensificação ainda maior dos sistemas de produção de peixes, produzindo-se maior quantidade de indivíduos e/ou biomassa no menor volume de água possível (FAO, 2010). Os recursos hídricos interiores abundantes, o clima tropical e espécies de peixes que apresentam aptidão para a piscicultura criam no Brasil um bom potencial para a produção de peixes sem concorrer em espaço físico com a agropecuária, pois a piscicultura pode ser praticada em áreas impróprias para agricultura tradicional, e.g. solos não agriculturáveis, ou ainda conferir usos múltiplos a grandes coleções de água, como os reservatórios de hidrelétricas (CYRINO et al., 2004).

No entanto, à medida que se intensifica a forma de produção de uma espécie qualquer, aumentam as chances da ocorrência de surtos epizooticos nos estoques confinados, acarretando em grandes perdas econômicas, especialmente como resultado da elevada densidade populacional (SODERBERG, 1995) e intensidade das práticas de manejo da produção, como transporte, desinfecção, reprodução artificial, etc. Estas práticas criatórias impõem certo nível de estresse com reflexos na homeostasia dos peixes, ocasionando uma maior sensibilidade e, como consequência, menor resistência às enfermidades, principalmente aos patógenos secundários (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1999; SAKAI, 1999; KUSUDA; KAWAI, 1998). Grande parte desses organismos que ocorrem no ambiente, como saprófitas, utiliza o material orgânico e mineral presente no sedimento dos sistemas de produção para crescimento e multiplicação (HERMAN; BULLOCK, 1986). Geralmente estes microrganismos são cosmopolitas característicos da água doce que, fazendo parte da microbiota aquática e intestinal de animais aquáticos saudáveis, em circunstâncias apropriadas tornam-se patogênicos causando a septicemia hemorrágica, por exemplo, que pode resultar em altas taxas de mortalidade (ROBERTS, 1994). Uma vez instalada a infecção, muito trabalho e tempo são investidos na tentativa de eliminar o agente patogênico do sistema de produção. Em adição, peixes resistentes infectados podem tornar-se vetores do agente etiológico no ambiente (KUSUDA; KAWAI, 1998). Para evitar essas epizootias, a prevenção das doenças aparece como alternativa mais interessante que o tratamento medicamentoso

(MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009), principalmente pelo fato de que o uso constante e indevido de medicamentos específicos, como antibióticos, pode gerar cepas resistentes e mais patogênicas. A vacinação tende a ser o método mais eficaz para controle das enfermidades em peixes, mas ainda é uma área em desenvolvimento (SAKAI, 1999; HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011).

Nesse contexto, e de modo ideal, trabalha-se com profilaxia, ou seja, tenta-se evitar o uso de tratamento medicamentoso, mantendo um ambiente saudável ou dando aos animais a capacidade de combater os agentes patogênicos *per se*, mesmo em condições de ambientes degradados, através do estímulo de suas funções imunológicas. Como o próprio nome diz, os imunoestimulantes são substâncias utilizadas para estimular a função de defesa imunológica do organismo (SCHRECK; MOYLE, 1990). Levando-se em consideração que o melhor entendimento e o desenvolvimento de técnicas de fortalecimento imunológico sem dúvida contribuirá para a melhoria na criação de peixes, este trabalho estudou formas de prevenção de doenças em peixes através do uso de imunoestimulantes dietéticos (vitamina E e levamisol).

Pouco se conhece a respeito da farmacocinética dos imunoestimulantes em peixes. Tais informações são indispensáveis para o uso sistemático destas substâncias na profilaxia das doenças em piscicultura, em especial para inclusão destes imunoestimulantes na dieta das várias espécies utilizadas em piscicultura em quantidades adequadas. O estudo farmacocinético de um produto fornece informações a respeito da biodisponibilidade (e.g. concentração plasmática máxima, o tempo de início de ação, constantes de eliminação, meia vida), distribuição, metabolismo e eliminação, tempo de depuração, dentre outros. Também não existe um corpo de informações consistentes em relação à eficácia destes agentes *in vivo*, especialmente frente a fatores inerentes a um sistema de produção intensiva. A finalidade precípua da piscicultura é a produção de pescado para consumo humano. Por este motivo, este trabalho objetivou, também, definir os parâmetros da farmacocinética do levamisol em peixes, em especial determinar o tempo ideal necessário para os que animais metabolizem e eliminem a substância do organismo e sejam disponibilizados na forma de pescado para o consumo humano em condições de risco zero de contaminação por substâncias exógenas, ou seja, em estado de depuração biológica.

## 1.1 Sistema imunológico em peixes

Como qualquer outro animal, os peixes são suscetíveis a infecções bacterianas, fúngicas ou virais e a infestações parasitárias. A resposta de defesa do organismo frente qualquer enfermidade engloba um componente, a reação imunológica, processo em que interagem todos os mecanismos do sistema de defesa na tentativa de promover a proteção do organismo frente aos agentes infecciosos, tanto no meio externo como interno (BALFRY; HIGGS, 2001). A resposta imunológica pode ser não específica (imunidade natural), aparecendo como um mecanismo de defesa inato que confere ao hospedeiro a resistência a infecções, ou adquirida, um processo específico induzido em resposta a um agente externo (SAKAI, 1999). Respostas específicas mediadas por células são aquelas que operam em um nível localizado, no lugar do trauma ou invasão, enquanto as respostas humorais específicas são as imunoglobulinas, que proporcionam uma defesa generalizada através do sistema circulatório e muco (ANDERSON, 1974; SINDERMANN, 1990; SHEPHERD, 1992; DALMO; INGEBRIGTSEN; BOGWALD, 1997; IWAMA et al., 1997).

O sistema imunológico inato é de vital importância para os mecanismos de resistência a doenças em peixes, principalmente devido à resposta imunológica adquirida ser geralmente lenta em muitas espécies (MAGNADÓTTIR, 2006). Defesas não específicas precedem a produção específica de anticorpos. As respostas não específicas à presença de antígenos externos têm componentes celulares e humorais. A principal resposta celular não específica é a fagocitose, através de células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos e células “natural killer” [NK], bem como os linfócitos T e B, que também participam desta resposta celular. A principal resposta humoral não específica inclui fatores de aglutinação, lise e precipitação presentes nos fluidos corporais, tais como lisozima, sistema complemento na via clássica ou alternativa, proteína C-reativa, properdina, hemolisina natural, transferrina, interleucina 2, interferon e fatores de ativação de macrófagos (SECOMBES; HARDIE; DANIELS, 1996; SAKAI, 1999).

A lisozima é uma enzima antibacteriana que destrói a parede celular de bactérias. Seu substrato é a ligação glicosídica  $\beta(1-4)$  entre o ácido n-acetilmurâmico e a n-acetilglicosamina. Ela é comumente encontrada em células e em secreções dos vertebrados. As propriedades bactericidas da lisozima são principalmente atribuídas às suas atividades enzimáticas, resultando em hidrólise da ligação- $\beta$  entre o ácido n-acetilmurâmico e a n-acetilglicosamina do peptideoglicano bacteriano, causando lise da célula (LOPERA et al., 2008). A lisozima é conhecida por atacar principalmente bactérias Gram positivas, mas

também algumas Gram negativas, em conjunto com o sistema complemento (ALEXANDER; INGRAM, 1992; GOPALAKANNAN; ARUL, 2006). No entanto, existem muitas evidências sobre a existência de modos de ação não enzimáticos e não líticos da lisozima que ainda não estão bem caracterizadas (GINSBURG, 2004; MASSCHALCK; MICHIELS, 2003). A ação antimicrobiana da lisozima contribui com a defesa inata e os mecanismos de fagocitose do hospedeiro (COLE; LIAO; STUHLIK, 2002). A lisozima está presente nos grânulos fagocíticos de neutrófilos, bem como nos monócitos, macrófagos e células epiteliais (LOPERA et al., 2008).

Outro exemplo da importância dos mecanismos do sistema imune não específico é a atividade fagocítica; sendo a habilidade dos macrófagos em combater e matar os microrganismos um dos mais importantes mecanismos de proteção contra doenças em peixes (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006). O mecanismo de morte de invasores pelos macrófagos pode ser categorizado como oxigênio dependente ou oxigênio independente. O primeiro é mediado por espécies reativas de oxigênio [EROs] (SAKAI; KOBAYASHI; KAWAUCHI, 1995; KAJITA et al., 1990). Da mesma forma, destaca-se a importância das espécies reativas de nitrogênio no mecanismo de combate de patógenos pelos macrófagos (SAKAI, 1999). Neste processo, os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) exercem importante função na modulação do sistema imune inato e consequente extermínio do patógeno. Durante o processo da fagocitose ocorre grande aumento do consumo do oxigênio molecular, mecanismo conhecido como *burst* oxidativo ou explosão respiratória, que decorre da redução do oxigênio em ânion superóxido, o qual, através da ação da enzima superóxido dismutase [SOD], forma peróxido de hidrogênio [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. O peróxido de hidrogênio sofre ação da enzima mieloperoxidase [MPO] liberada pelos leucócitos granulares, transformando-se em hipoclorito e levando à produção de cloraminas. Todas estas espécies reativas de oxigênio são extremamente bactericidas e contribuem ativamente para sua destruição, pois são substâncias oxidantes que atuam sobre membranas de microrganismos (BASHEERA et al., 2002). A determinação das EROs produzidas pela explosão respiratória pode ser feita por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* [NBT] que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990).

A primeira barreira de um potencial parasita na pele é o muco e as substâncias nele existentes, incluindo a lisozima, lectinas, proteinases e imunoglobulinas. As escamas e a células queratinizadas também oferecem proteção na forma de barreira mecânica contra o invasor. No caso de ausência de escamas, como em peixes de couro, ocorre uma produção

aumentada de muco. Se mesmo assim o parasita conseguir entrar no organismo do hospedeiro, um sistema mais complexo de defesa é ativado. Uma vez no sangue ou tecido linfático, hidrolases como a lisozima, sistema complemento, lectinas e imunoglobulinas, irão se complexar com o parasita em um processo de lise ou opsonização para que, mais tarde, o parasita seja fagocitado por leucócitos. Ao mesmo tempo, fatores como a transferrina e ceruloplasmina agem deprimindo o parasita de íons metálicos essenciais, retardando a sua reprodução e crescimento. Caso o invasor consiga atingir a célula, respostas intracelulares, como o interferon, são iniciadas. O interferon, outra proteína encontrada tanto nas células quanto no soro, tem importância como antiviral, pois interrompe o metabolismo e a replicação viral dentro da célula. Inibidores enzimáticos, como as globulinas, estão também envolvidos na atividade contra bactérias inibindo a ação de proteases secretadas pelos patógenos. Neste tempo em que o sistema imune não específico age e controla infecção pelo patógeno, os mecanismos de defesa específicos são mobilizados (ALEXANDER; INGRAM, 1992).

Os peixes diferem dos vertebrados mais evoluídos no que diz respeito ao tempo necessário para iniciar a resposta imune específica. Em aves e mamíferos, por exemplo, esta resposta ocorre em 48 horas, enquanto que em peixes entre 7-14 dias, dependendo da temperatura ambiental. Isto justifica a existência de um mecanismo humoral de defesa não específico bastante variado, aliado também ao fato da resposta específica através de imunoglobulinas ser ineficiente, ou melhor, primitiva, em comparação aos vertebrados superiores (WILSON; WARR, 1992). Em peixes, as imunoglobulinas apresentam menos diversidade de tipos e a resposta é mais prolongada (ELLIS, 1989). Dessa forma, os animais precisam de alternativas para combater rapidamente a colonização de um agente etiológico ou parasita até que a resposta adaptativa possa se estabelecer (ALEXANDER; INGRAM, 1992).

Comparando-se com os demais animais, o mecanismo de defesa dos peixes comporta-se, em parte, de maneira diferente. Nos peixes este mecanismo é influenciado por fatores como temperatura, qualidade da água e fontes estressoras. Os anticorpos dos peixes são bioquimicamente diferentes e menos eficientes que os dos mamíferos, e poucos são os organismos patogênicos que atacam os peixes e podem causar algum problema para os humanos (BRANDÃO, 1988). Avaliar respostas imunológicas em peixes não é tarefa das mais fáceis. Em peixes não é raro ocorrer variabilidade individual nas respostas fisiológicas, incluindo as imunológicas. Fatores como a variação genética, alterações ambientais, condições de estresse, alimentação, estado nutricional e tipo de patógeno, todos interferem no resultado/forma da resposta orgânica em peixes (DEMERS; BAYNE, 1997; SHOEMAKER; KLESJUS; LIM, 2001).



## 1.2 Nutrição e imunidade

Estudos demonstrando interações entre dieta e imunidade na busca pela manutenção ou melhora da saúde dos peixes têm merecido atenção dos pesquisadores. O entendimento do efeito da alimentação no desenvolvimento das doenças pode ser de grande importância para diminuir os efeitos do patógeno e a recuperação dos animais possibilitando, inclusive, o não uso de medicamentos como os antibióticos (LI et al., 2006). Uma nutrição apropriada e adequada é um ponto importante na promoção de um crescimento normal, sustentável e saudável dos peixes. A alimentação não só supre os nutrientes essenciais que são exigidos para o funcionamento normal do organismo, mas também é um meio pelo qual os peixes são expostos a outros componentes que podem afetar sua saúde, positivamente ou negativamente. Por exemplo, a deficiência de um nutriente pode afetar diretamente a saúde dos peixes devido ao desbalanceamento de funções metabólicas, ou indiretamente tornando os peixes mais susceptíveis a agentes patogênicos oportunistas. Por este motivo, as dietas artificiais usadas em aquicultura são formuladas para suprir adequadamente as quantidades de todos os nutrientes podendo, assim, favorecer a manutenção da saúde (GATLIN III, 2002; SHERIDAN, 1988). Neste sentido, a composição da dieta afeta tanto o sistema de defesa inato quanto a resposta dos anticorpos dos peixes. Ou seja, não somente as dietas estão diretamente relacionadas com a função imunológica (número e atividade de leucócitos, diminuição da atividade hemolítica do soro etc.), como também a susceptibilidade do animal às doenças infecciosas pode estar relacionada com a inanição ou má nutrição (ALCORN et al., 2003; BLAZER, 1991).

No sistema imune não específico não existe memória e a resposta imune é de curta duração. O uso de imunostimulantes é um eficiente meio de aumentar a imunocompetência e resistência a doenças em peixes (SAKAI, 1999). Assim sendo, pesquisas que focam na interação entre nutrição e imunidade como alternativa ao uso de antibióticos têm recebido atenção em nutrição e produção de rações para aquicultura, com destaque para o uso de aditivos dietéticos como probióticos, prebióticos e imunostimulantes na alimentação animal (LI et al., 2006). A alimentação afeta tanto o sistema imune quanto o endócrino dos peixes; por sua vez, estes sistemas interagem e afetam um ao outro. O hormônio do crescimento, por exemplo, age também na regulação de inúmeros processos fisiológicos em salmonídeos, e.g. hematopoiese, função fagocítica celular e resistência a infecções bacterianas (SAKAI et al., 1997).

As práticas de alimentação, bem como mudanças no manejo alimentar, podem influenciar a resistência a doenças dos peixes, i.e., o status nutricional pode estimular o sistema imune ou mesmo retardar o crescimento da população dos organismos patogênicos (GATLIN III, 2002). A restrição alimentar é, quase sempre, associada à redução no crescimento (SALAS-LEITON et al., 2010) e, ainda, convencionalmente, tem-se que a saúde dos peixes está associada a uma alimentação completa e diária (GATLIN III, 2002). Em contrapartida, evidências empíricas na aquicultura comercial indicam que certos desvios na alimentação, como a não saciedade e não alimentação diária, podem influenciar significativamente a saúde dos peixes e a resistência a doenças. Nos sistemas de produção do bagre do canal *Ictalurus punctatus*, por exemplo, é prática corrente suspender a alimentação quando os peixes estão acometidos por alguma infecção bacteriana, como *Edwardsiella ictaluri*. Registros de observações feitas pelos próprios criadores demonstram que a redução ou mesmo a suspensão da alimentação reduz a mortalidade durante algumas epizootias (LOVELL; OKWOCHE; KIM, 2001).

Outro exemplo da influência da alimentação na resposta imune é que a taxa de alimentação pode afetar a habilidade dos peixes em resistir a infecções, sendo que, muitas vezes, as atividades celulares como a fagocitose são inversamente proporcional a taxa de alimentação (PIRHONEN; SCHRECK; GANNAM, 2000; GATLIN III, 2002; ALCORN et al., 2003). Ainda a este respeito, verificou-se que a restrição alimentar dos peixes afeta a concentração e composição dos leucócitos sanguíneos (MAHAJAN; DHEER, 1983), diminuição na atividade hemolítica e resposta de anticorpos (HENKEN; TIGCHELAAR; Van MUISWINKEL, 1987).

Ainda, existem evidências de que níveis elevados de certos micronutrientes nos tecidos podem predispor os peixes a infecções, de forma que em se restringindo alguns destes micronutrientes na dieta pode-se melhorar a resistência a doenças em peixes. A suplementação de certos nutrientes em níveis abaixo da exigência mínima pode melhorar a resposta imune e a resistência a doenças em inúmeros animais terrestres (REDDY; FREY 1990) bem como em várias espécies de peixes (LANDOLT, 1989; GATLIN III, 2002). Por exemplo, o ferro aparentemente tem importante função nas infecções bacterianas, aumentando a virulência dos microrganismos invasores. Sendo assim, a restrição da disponibilidade orgânica deste mineral pode servir como mecanismo de prevenção contra infecções (WEINBERG, 1989).

### 1.3 Imunoestimulantes

A vacinação, a quimioterapêutica e a imunoestimulação são os principais métodos para controlar doenças em peixes. Com intuito de aumentar a resistência dos animais através do incremento de suas funções imunológicas, pode-se lançar mão dos aditivos alimentares denominados imunoestimulantes. Os imunoestimulantes aumentam a resistência às enfermidades infecciosas, potencializando a ação do sistema imune não específico, aumentando a capacidade de fagocitose de macrófagos e suas propriedades bactericidas. Pensando-se em prevenção de doenças em animais, os imunoestimulantes podem ser usados como alternativa à vacinação ou como adjuvante nesta prática, uma vez que administrados em associação às vacinas também afetam positivamente a resposta imune específica (ANDERSON, 1992).

Didaticamente os imunoestimulantes podem ser divididos em dois grupos: químicos sintéticos e substâncias biológicas. Por sua vez, o grupo das substâncias biológicas é subdividido em derivados de bactérias, derivados de algas, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, fatores nutricionais (nutrientes e aditivos, como as vitaminas), hormônios e citocinas (SAKAI, 1999). Estes compostos, em geral, são de baixa toxicidade e podem ser facilmente administrados por imersão, injeção ou, de maneira mais prática, como suplemento alimentar (SAKAI, 1999; SMITH; BROWN; HAUTON, 2003). Os imunoestimulantes são tidos como uma maneira de compensar as limitações das vacinas e quimioterapia. São mais seguros do que os quimioterápicos e teriam uma maior amplitude em relação às vacinas. No entanto, ainda é preciso uma discussão mais ampla a respeito das limitações e eficácias dos imunoestimulantes para que se possa entender e tornar realidade seu uso como uma importante ferramenta no controle de doenças de peixes (SAKAI, 1999).

Os imunoestimulantes aumentam a resistência a doenças infecciosas melhorando, principalmente, os mecanismos de defesa não específicos em animais (celular e a defesa humoral) (ANDERSON, 1992), fato que incentiva o seu uso, desenvolvimento e estudos associados (Tabela 1). Dentre os vários compostos testados em peixes, alguns já apresentaram atividade imunoestimulatória:  $\beta$ -glucano, quitosana, vitaminas, peptidioglicanos e o levamisol (SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1994; SIWICKI et al., 2001; MULERO et al., 1998; CUESTA; ESTEBAN; MESEGUER, 2002). O uso de imunoestimulantes poderia ser muito útil como tratamento profilático em certos períodos quando se esperaria uma imunodeficiência, como no inverno e manejos, por exemplo, situações em que os peixes reduzem o consumo alimentar devido às condições adversas. Nestes momentos o estresse

aumenta a susceptibilidade a doenças e estas substâncias poderiam oferecer proteção contra doenças justamente por serem eficazes na modulação da defesa imunológica (JENEY; ANDERSON, 1993; SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1994, MULERO et al., 1998, CUESTA; MESEGUER; ESTEBAN, 2002).

Tabela 1 - Comparação das características do uso da quimioterapêutica, vacinas e imunostimulantes em peixes

	Quimioterapêutica	Vacina	Imunostimulantes
Quando	Terapeuticamente	Profilaticamente	Profilaticamente
Eficiência	Excelente	Excelente	Bom
Espectro de atividade	Médio	Limitado	Amplio
Duração	Curta	Longa	Curta

Adaptado de Sakai (1999).

Vários efeitos celulares resultantes do uso de imunostimulantes têm sido descritos. Os linfócitos podem ser ativados por imunostimulantes, e.g. a concanavalina-A, que aumenta a atividade mitogênica, ou lipopolissacarídeos, que agem como fatores de ativação de macrófagos (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1991; SIWICKI et al., 1996). O sistema complemento também pode ser ativado por muitos imunostimulantes, como já registrado para a vitamina C e o glucano de levedura em salmão do Atlântico, *Salmo salar* (ENGSTAD; ROBERTSEN; FRIVOLD, 1992; HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1991), bem como as células NK podem ser ativadas pelo hormônio do crescimento e levamisol (KAJITA et al., 1990; KAJITA et al., 1992). A produção de anticorpos pode ser estimulada pela inclusão de vitamina C na dieta, como registrado para o salmão do Atlântico após imunização com *Aeromonas salmonicida*, com o glucano de leveduras incluído na dieta do bagre do canal imunizado contra *Edwardsiella ictaluri* (CHEN; AINSWORTH, 1992) e do salmão do Atlântico imunizado contra *Aeromonas salmonicida* (AAKRE et al. 1994). Finalmente, porque os imunostimulantes podem ativar macrófagos, neutrófilos, células NK e células T e, assim, potencializar a habilidade natural dos organismos destruírem células tumorais, muitas pesquisas com imunostimulantes focam também compostos que podem ser aplicáveis ao tratamento do câncer em humanos e animais (ANDERSON, 1992; NISHIMURA et al., 1984; SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1994; SUZUKI et al., 1984).

Imunomoduladores podem atuar sobre o sistema imune humoral e/ou sobre as células de defesa, como registrado para o 1,3  $\beta$ -glucano, que comprovadamente afeta a atividade de anticorpos, sistema complemento, interleucina tipo I, interferon, além de agir diretamente sobre as células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) melhorando suas atividades. A melhoria das atividades de células fagocíticas resulta do aumento da

produção de EROs durante a explosão respiratória, o que contribui para a destruição dos microrganismos (RAA, 1996; VERLHAC et al., 1998). Outros exemplos de sucesso do uso de imunoestimulantes na melhora do bem estar, saúde e produção de peixes são o aumento da resistência após desafios bacterianos, efeitos antiparasitários, resistência à infecção viral, aumento dos níveis de interferon, lisozima, produção de anticorpos após vacinação, aumento da proliferação celular e da atividade de macrófagos, fagocitose, produção de radicais livres, atividade enzimática, produção de citocinas, produção de óxido nítrico e destruição de bactérias (BRICKNELL; DALMO, 2005; ENGSTAD; ROBERTSEN; FRIVOLD, 1992; JORGENSEN et al., 1993).

Os efeitos dos imunoestimulantes não são dose-dependente. Além de não serem eficientes, altas dosagens podem também inibir a resposta imune. Por exemplo, injeção de levamisol em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* na dose 0,1 e 0,5 mg kg<sup>-1</sup> melhorou a atividade fagocítica de leucócitos, enquanto que a dose de 5 mg kg<sup>-1</sup> não apresentou atividade (KAJITA et al., 1990). Por isso, efeitos em longo prazo ainda não estão bem esclarecidos e o período de administração deve ser determinado para cada imunoestimulante (SAKAI, 1999; SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1994). Por exemplo, trutas arco-íris alimentadas por 56 dias com peptidioglicano não apresentaram melhora nas respostas imunológicas em desafio com *V. anguillarum*, mas quando o período de alimentação foi de 28 dias, foram registradas melhores respostas imunológicas (MATSUO; MIYAZANO, 1993). Em trabalho com a espécie bagre africano *Clarias gariepinus*, foi registrada melhora na atividade de células fagocíticas aos 40 dias, mas não aos 45 dias após a administração oral de glucano e oligossacarídeo (YOSHIDA; KRUGER; INGLIS, 1995).

Apesar dos resultados positivos em diversos estudos, os imunoestimulantes não são capazes de proteger todas as espécies de peixes contra várias doenças. Alguns peixes que receberam imunoestimulantes mostraram melhora na resistência a infecções bacterianas como *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *A. salmonicida* e *Streptococcus* sp., infecção viral como necrose infecciosa hematopoiética [infectious hematopoietic necrosis – IHN] e baculovirus e, ainda, melhora na proteção contra alguns parasitas, como a doença de pontos brancos (SAKAI, 1999); a principal função imunológica dos imunoestimulantes é a melhora na atividade das células fagocíticas. No entanto, algumas bactérias, e.g. *R. salmoninarum*, *P. piscicida* e *E. ictaluri*, são resistentes à fagocitose, podendo sobreviver dentro dos macrófagos (GUTENBERGER et al., 1997). Os imunoestimulantes não parecem efetivos contra as infecções por estes agentes etiológicos (SAKAI 1999).

Aparentemente existe relação entre imunoestimulação e promoção de crescimento. O camarão tigre *Penaeus monodon*, por exemplo, apresentou maior taxa de crescimento quando submetido a banho com glucano nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg mL<sup>-1</sup> (SUNG; KOU; SONG, 1994); além de melhorar o desempenho, o hormônio do crescimento melhora a atividade de macrófagos e a resistência contra *V. anguillarum* em truta arco-íris (SAKAI; KOBAYASHI; KAWAUCHI, 1995, 1996a,b). No entanto, peptidioglicanos administrados oralmente por 60 dias para trutas arco-íris como imunoestimulantes não influenciaram o seu crescimento (MATSUO; MIYAZANO, 1993).

Sem dúvida, uma melhora na condição imune do organismo por manipulação dietética representaria uma importante alternativa ao uso de drogas na aquicultura. Os efeitos profiláticos e a praticidade têm encorajado o uso de imunoestimulantes pelos piscicultores. Entretanto, ainda permanecem dúvidas a respeito da real eficácia, melhor período de administração e, principalmente, se imunoestimulantes podem proteger organismos aquáticos contra todas as doenças infecciosas (SAKAI, 1999).

#### 1.4 Levamisol

O levamisol (Figura 1) é um composto químico sintético do grupo dos imidazotiazóis, utilizado como anti-helmíntico em casos de infecção por nematódeos em humanos e animais, sendo a forma levógira do tetramisol mais potente que a sua forma dextrógira. Farmacologicamente, o levamisol estimula gânglios simpáticos e parassimpáticos causando paralisia dos vermes, matando-os e ainda possibilitando a eliminação passiva (JANSSEN, 1976<sup>1</sup> apud MORRISON; NOWAK; CARSON, 2001). É um fármaco estudado em diversas áreas, com destaque para a atividade imunoestimulatória no homem e animais, incluindo peixes e camarões (LI; WANG; GATLIN III, 2006). O efeito imunoestimulante do levamisol é caracterizado pelo aumento da resposta imunológica não específica (BONAMIN; PAULINO, 1996). Por que é utilizado em produção animal, a toxicidade e o resíduo tecidual do levamisol já foram relatados para alguns animais, mas não para peixes (CUESTA; MESEGUER; ESTEBAN, 2002).

---

<sup>1</sup> JANSSEN, P.A., 1976. The levamisole story. **Progress in Drug Research**, Basel, v. 20, p. 347–383.

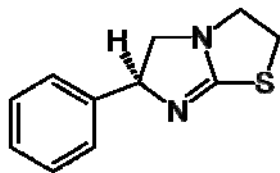


Figura 1 - Estrutura química do levamisol

Usado como adjuvante em vacinas para peixes, o levamisol apresentou algumas vantagens. Quando usado concomitantemente com vacinas contra *Aeromonas salmonicida* em truta arco-íris favoreceu o aumento no nível de anticorpos circulantes e o aumento da resposta destes e de parâmetros imunológicos não específicos, tanto em administração por injeção, 5 $\mu$ g por peixe (ANDERSON; JENEY, 1992), quanto por imersão, 5 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (JENEY; ANDERSON, 1993). Da mesma forma, o levamisol mostrou-se capaz em melhorar a resistência para bactérias patogênicas como *Vibrio anguillarum* em truta arco-íris (KAJITA et al., 1990), *A. hydrophila* em carpa *Cyprinus carpio* (BABA; WATASE; YOSHINAGA; 1993; GOPALAKANNAN; ARUL, 2006), *Paramoeba* sp. em salmão do Atlântico (FINDLAY; MUNDAY, 2000), *Edwardsiella tarda* em carpa indiana *Labeo rohita* (SAHOO; MUKHERJEE, 2002) e *Acinetobacter lwoffii* no bagre africano *Clarias fuscus* (LI et al., 2006). Finalmente, o levamisol pode aumentar o número, o metabolismo e a atividade de fagócitos em peixes (KAJITA et al., 1990; SIWICKI, 1987; SIWICKI, 1989; SIWICKI et al., 1996; SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1990; SYMOENS; ROSENTHAL, 1977).

Os efeitos imunoestimulatórios do levamisol são bastante estudados para peixes, porém ainda não existe um consenso em relação a sua real efetividade, bem como não existe um protocolo definido para sua utilização. O mais prático, tratando-se de produção animal, seria incorporá-lo na ração e administrá-lo oralmente aos animais. No entanto, em situações laboratoriais diversas formas de administração são usadas e testadas, como via oral, banho, e também *in vitro*. Da mesma forma, ainda existem dúvidas a respeito do período de administração deste fármaco (variam de 7-90 dias) e quanto tempo é necessário para ele agir ou mostrar o efeito esperado, a curto ou em longo prazo. Ainda, por se tratar de um produto que objetiva agir sobre o sistema imunológico, nem sempre estes estudos exploram o efeito do levamisol sobre o desempenho zootécnico, e quando é realizado, este fármaco nem sempre influencia o crescimento. Tratando-se de resposta imunológica, que é mais diversa, as variáveis mais comumente testadas são a atividade respiratória dos leucócitos e a atividade de lisozima sérica. No entanto, devido a toda esta diversidade de variáveis normalmente avaliadas, uma ampla variação na dose ideal recomendada é também encontrada, variando,

por exemplo, de 50 a 1000 mg kg<sup>-1</sup> ração quanto ao efeito no sistema imunológico e de 100-250 mg kg<sup>-1</sup> ração referentes ao desempenho. A Tabela 2 resume o corpo de conhecimentos sobre os efeitos do levamisol em peixes, tanto em situações *in vivo* como *in vitro*.



Tabela 2 - Estudos avaliando a atividade do levamisol em peixes (continua)

Espécie	Via	Dose testada	Tempo de tratamento	Avaliação da atividade	Dose ideal		Variáveis		Referência
					Desempenho	Imunológica	Atividade	Não atividade	
Dourada <i>Sparus aurata</i>	oral	0-500 mg kg <sup>-1</sup> ração	10 dias	após 5 semanas	125 mg kg <sup>-1</sup> ração	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i>		MULERO et al., 1998
“Sunshine bass” <i>M. chrysops</i> ♀ x ♂ <i>M. saxatilis</i>	oral	0-1000 mg kg <sup>-1</sup> ração	21 dias	21º dia	100 mg kg <sup>-1</sup> ração	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i>	lisozima	LI; WANG; GATLIN III, 2006
Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	oral	0-500 mg kg <sup>-1</sup> ração	70 dias	57º e 70º dias	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i> e lisozima		MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009
Bagre asiático <i>Clarias batrachus</i>	oral	50 mg kg <sup>-1</sup> ração	10 dias	10º dia	-	50 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i>		KUMARI; SAHOO, 2006
Carpa ‘rohu’ <i>Labeo rohita</i>	oral	5 mg kg <sup>-1</sup> corpóreo	60 dias, a cada 3 dias	60º dia	-	5 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i> e lisozima	proteína e albumina	SAHOO; MUKHERJEE, 2001
Carpa	oral	5 mg kg <sup>-1</sup> corpóreo	15 dias, a cada 3 dias	1, 2, 4, 8, 12 semanas após a última administração	-	5 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i> (2 -8 semanas), lisozima (4-12 semanas)		SIWICKI, 1989
Bagre africano <i>Clarias fuscus</i>	oral	0-600 mg kg <sup>-1</sup> ração	7 dias	0, 2, 4, 6, e 8 semanas após a última administração	-	150-300 mg kg <sup>-1</sup> ração	lisozima	proliferação de leucócitos	LI et al., 2006
Pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	oral	0-800 mg kg <sup>-1</sup> ração	30 dias	15 dias após a última administração	sem efeito	100 mg kg <sup>-1</sup> ração	produção de leucócitos	proteína plasmática	SADO; BICUDO; CYRINO, 2010
Carpa	oral	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	90 dias	90º dia	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	lisozima e <i>burst</i>		GOPALAKANNAN; ARUL, 2006
Beijupirá <i>Rachycentron canadum</i>	oral	0, 500 e 1000 mg kg <sup>-1</sup> ração	14 dias	14º dia	-	1000 mg kg <sup>-1</sup> ração	atividade fagocítica e <i>burst</i>	lisozima	GOPALAKANNAN; ARUL, 2006

Tabela 2 - Estudos avaliando a atividade do levamisol em peixes ( continuação)

Espécie	Via	Dose testada	Tempo de tratamento	Avaliação da atividade	Dose ideal		Variáveis		Referência
					Desempenho	Imunológica	Atividade	Não atividade	
Rohu	oral	0-500 mg kg <sup>-1</sup> ração	56 dias	14 <sup>o</sup> , 28 <sup>o</sup> , 42 <sup>o</sup> e 56 <sup>o</sup> dias	sem efeito	125 mg kg <sup>-1</sup> ração	proteína, albumina, globulina, lisozima, produção e atividade leucocitária	produção de ânion superóxido	MISRA; DAS; MUKHERJEE, 2009
Rohu	oral	5 mg kg <sup>-1</sup> corpóreo	16 dias, a cada 3 dias	14 <sup>o</sup> e 21 <sup>o</sup> dias após o tratamento	-	-	leucócitos totais, proteína e imunoglobulinas, <i>burst</i> , atividade fagocítica e lisozima		WIJENDRA; PATHIRATNE, 2007
“Sunshine bass”	oral	0, 500 e 1000 mg kg <sup>-1</sup> ração	28 dias	28 <sup>o</sup> dia	sem efeito	-	-	suprimiu crescimento na dose de 1000 mg kg <sup>-1</sup> de ração	LI; WANG; GATLIN III, 2004
Dourada <i>Spaarus aurata</i>	oral	0-300 mg kg <sup>-1</sup> ração	10 dias	0, 1, 2, 3, 4 e 6 semanas após última administração	-	50-300 mg kg <sup>-1</sup> ração	atividade citotóxica		CUESTA; MESEGUER; ESTEBAN, 2002
Salmão do Atlântico <i>Salmo salar</i>	banho	2,5 mg L <sup>-1</sup>	2 horas	após 2 semanas	-	-	lisozima, atividade fagocítica		FINDLAY; MUNDAY, 2000
Catla <i>Catla catla</i>	banho	0; 1,25 e 2,5 mg L <sup>-1</sup>	2 horas	após 14, 21, 28, 42 e 56 dias	-	1,25 e 2,5 mg L <sup>-1</sup>	proteína sérica, atividade fagocítica e <i>burst</i> , aos 42 dias	globulinas	PERERA; PATHIRATNE, 2008
Truta arco-íris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	banho	0-10 µg mL <sup>-1</sup>	1 hora	após 1, 7 e 14 dias	-	-	<i>burst</i> , atividade fagocítica		ISPIR; YONAR, 2007
Truta arco-íris	injeção	5 mg kg <sup>-1</sup> corpóreo		Após 3, 7, 10 e 14 dias	-	-	<i>burst</i> , atividade fagocítica (todos tempos de coleta)	globulinas	ISPIR; DÖRÜCÜ, 2005
Dourada	ensaio <i>in vitro</i> com leucócitos	0,001-1000 ng mL <sup>-1</sup>	incubação por 4, 24 ou 48 horas		-	0,001; 0,01; 10 e 100 ng mL <sup>-1</sup>	atividade citotóxica, 24 horas		CUESTA; MESEGUER; ESTEBAN, 2002

Tabela 2 - Estudos avaliando a atividade do levamisol em peixes (continuação)

Espécie	Via	Dose testada	Tempo de tratamento	Avaliação da atividade	Dose ideal		Variáveis		Referência
					Desempenho	Imunológica	Atividade	Não atividade	
Dourada	ensaio <i>in vitro</i> com leucócitos	0,001-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	incubação por 3, 6, 24 e 48 horas)	-	-			<i>burst</i> e atividade fagocítica	MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998a
Carpa	ensaio <i>in vitro</i> com leucócitos	0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	7 dias	após 7º dia	-	0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	proliferação celular		SIWICKI; COSSARINI-DUNIER, 1990
Tabela 2 - continuação									
Carpa	ensaio <i>in vitro</i> com macrófagos	0-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2 horas	-	-	0,8-6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	atividade fagocítica	acima de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é tóxico	SIWICKI; COSSARINI-DUNIER, 1990
"Sunshine bass"	ensaio <i>in vitro</i> com macrófagos	0-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	24, 48 e 72 horas	-	-		produção de ânion superóxido	tóxico na dose de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	LI; WANG; GATLIN III, 2004
Truta arco-íris	ensaio <i>in vitro</i> com baço	0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	4 dias	-	-	0,1-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	atividade fagocítica		JENEY; ANDERSON, 1993
Truta arco-íris	ensaio <i>in vitro</i> com baço	0-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	incubação por 10 dias	10º dia	-	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	atividade fagocítica	tóxico acima de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	SIWICKI; ANDERSON; DIXON, 1990

Apesar de estes inúmeros trabalhos mostrarem ação do levamisol sobre o sistema imunológico de peixes, existe alguns autores que afirmam que o uso deste fármaco em aquicultura pode não ser benéfico. Por exemplo, o estudo com o “sunshine bass” alimentados com dietas suplementadas com  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  resultou em sinais de toxicidade, como diminuição do crescimento, consumo de alimento e eficiência alimentar (LI et al., 2006). Ainda, para a espécie dourada, houve redução na explosão respiratória de macrófagos quando estes foram incubados em concentrações mais altas do que  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de levamisol (MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998a). Para o pacu, quando alimentado com dieta contendo  $800 \text{ mg kg}^{-1}$  de levamisol, foi verificada elevada glicose plasmática e, também, foi verificado que o levamisol não influenciou o crescimento. O aumento da glicose foi associado à liberação dos hormônios cortisol e catecolaminas, que estão relacionados à mobilização energética em situações de estresse. Como o estresse é um imunossupressor, entende-se que o uso de levamisol pode causar efeito supressivo quando administrado por longos períodos ou altas doses (SADO; BICUDO; CYRINO, 2010). Mesmo resultado foi obtido para beijupirá *Rachycentron canadum* (LEAÑO et al., 2004). Em outro estudo foi verificado que o levamisol pode resultar em alterações maléficas nos peixes, como patologias. Por exemplo, foram observadas alterações como aumento de permeabilidade branquial e, em resposta, hipersecreção de muco e hiperplasia do epitélio, quando o levamisol foi usado como adjuvante em vacinação (MORRISON; NOWAK; CARSON, 2001).

Com base no que foi exposto a respeito do uso do levamisol como imunoestimulante em peixes, pode-se dizer que este fármaco tem um efeito positivo no mecanismo de defesa não específico, melhorando a migração de macrófagos, a produção de radicais livres (oxidativos), a atividade da mieloperoxidase dos neutrófilos, o número e aderência de leucócitos, etc. Com isso, o levamisol é um produto com grande potencial para ser usado como agente preventivo em aquicultura (ANDERSON; JENEY, 1992; JENEY; ANDERSON, 1993; KAJITA et al., 1990). Em estudos *in vivo* é possível verificar que os fagócitos não são as células alvos do levamisol, mas sim os linfócitos pelo fato do aumento na produção de linfocinas, que afetaria diretamente a atividade dos fagócitos (SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1990). Ou então, que o levamisol poderia agir dentro dos macrófagos quando eles são previamente estimulados por outras substâncias, como lipopolissacarídeos, o que resultaria em maior produção de interleucinas (MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998a).

Considerando que altas doses de levamisol podem suprimir a resposta imune e doses muito baixas não ser efetivas, o seu uso em animais, especialmente em peixes, precisa ser feito com cautela. Com base nos dados pesquisados, em geral a melhor dose de levamisol para

peixes ficaria em torno de 250 mg kg<sup>-1</sup> de ração. No entanto, informações como uso prolongado, mecanismo de ação no ganho de peso, efeitos sobre hematologia e acúmulo tecidual são ainda escassos. Ou seja, apesar de ser um fármaco promissor, ainda é cedo para atestar os benefícios do levamisol e seu uso seguro em aquicultura.

## 1.5 Vitamina E

Vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o crescimento, reprodução e saúde dos animais; são diferentes de aminoácidos, carboidratos e lipídios e, necessariamente, são obtidos de fontes exógenas. Vitaminas são classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis, cada uma com específica função, importância e exigência. As vitaminas hidrossolúveis geralmente apresentam função de coenzima no metabolismo celular. Dentre as vitaminas hidrossolúveis, o ácido ascórbico (vitamina C), a colina e o inositol são os exigidos em maior quantidade devido à maior atividade metabólica. Já as vitaminas lipossolúveis apresentam funções independentemente de enzimas. São exemplos deste grupo as vitaminas A, D, E e K. Estas vitaminas são absorvidas ao longo do intestino juntamente com os lipídios dietéticos. Os lipídios e compostos lipossolúveis são transportados via veia porta. Quando a ingestão de vitaminas lipofílicas é além da necessidade metabólica, os animais as acumulam em compartimentos específicos na célula ou simplesmente no compartimento lipídico. Sendo assim, os animais podem acumular estas vitaminas até a ponto de se obter uma hipervitaminose (NRC, 2011).

Porque as vitaminas lipossolúveis podem ser estocadas no organismo, realização de pesquisas envolvendo suas exigências nutricionais é muito difícil, em especial relacionado ao tempo de carência necessário para a depleção destes compostos no organismo dos peixes, tempo este que é bastante variável entre espécies e condições experimentais. Desta forma, a quantidade da ingestão de vitaminas durante os meses que antecedem os experimentos influencia diretamente os resultados e os sinais de deficiência. Por este motivo existem pesquisas conflitantes a este respeito (NRC, 2011).

A vitamina E é uma descrição genérica para todas as moléculas que possuem a atividade biológica do  $\alpha$ -tocoferol. Naturalmente podem ser encontrados nos alimentos oito compostos com atividades de vitamina E, sendo a forma D- $\alpha$ -tocoferol a que possui maior atividade. Estas formas diferem quanto à posição de grupos metila no anel aromático e seus correspondentes tocotrienóis (Figura 2). Uma UI de vitamina E é definido como atividade

biológica equivalente a 1,0 mg de D- $\alpha$ -tocoferol (NRC, 2011) (Tabela 3). Os sinais de deficiência de vitamina E podem ser raquitismo, alteração na pigmentação da pele, hemorragia nas nadadeiras, degeneração muscular, anemia, fragilidade dos eritrócitos, apatia, redução de crescimento, mortalidade, deposição de lipídios e ceroides no fígado e baço, baixo índice hepatossomático, edema cardíaco, baixo hematócrito, ascite, lordose, etc. (HAMRE et al., 1997; NRC, 2011; ROEM; KOHLER; STICKNEY, 1990; PENG; GATLIN III, 2009; LEWIS-McCREA; LALL, 2007).

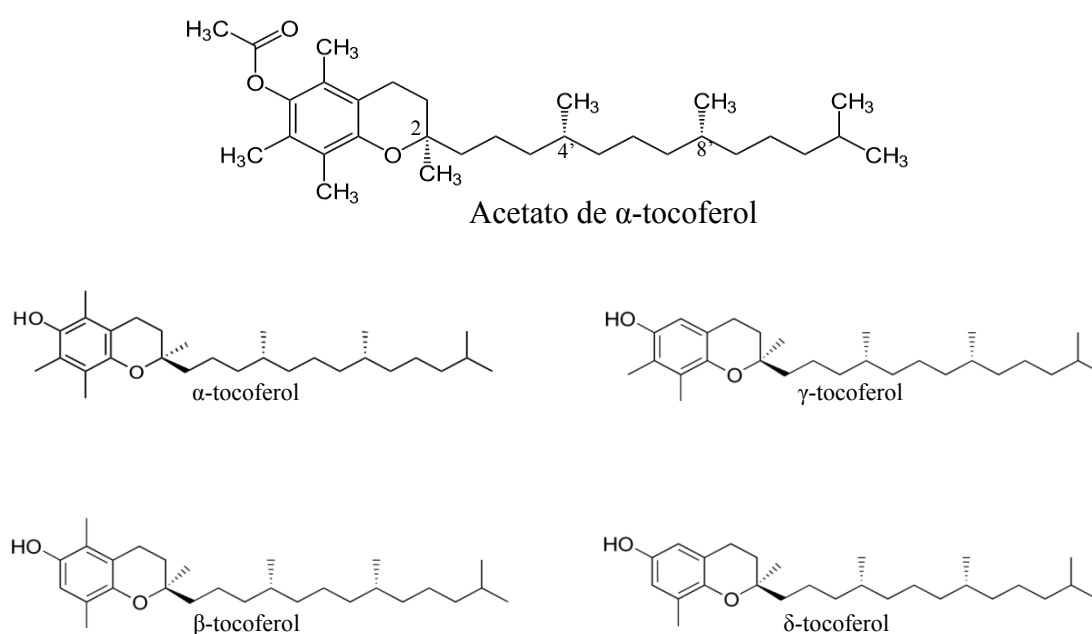


Figura 2 - Estrutura química da vitamina E (tocoferol) e seus principais isômeros. Os tocotrienóis possuem dupla-ligações nas posições C3', C7' e/ou C11'

Tabela 3- Potencial biológico dos compostos com atividade de vitamina E em relação ao d- $\alpha$ -tocoferol

Composto	D- $\alpha$ -tocoferol equivalentes
$\alpha$ -tocoferol	1,0
$\beta$ -tocoferol	0,5
$\gamma$ -tocoferol	0,1
$\delta$ -tocoferol	0,03
$\alpha$ -tocotrienol	0,3
$\beta$ -tocotrienol	0,05
$\gamma$ -tocotrienol	Desconhecido
$\delta$ -tocotrienol	Desconhecido

(Adaptado de Ng et al., 2004)

Como a forma livre da vitamina E (tocoferol) é instável e pode sofrer oxidação, a suplementação em rações é feita a partir dos ésteres acetato e succinato. Estes ésteres não possuem atividade antioxidante, mas são prontamente hidrolisados no trato digestório – normalmente catalisada pela esterase pancreática – para a forma livre do tocoferol, que é o composto bioativo (HUNG; SLINGER, 1982; RIGOTTI, 2007; NRC, 2011).

A absorção, trânsito intracelular e distribuição tecidual da vitamina E estão ligados ao transporte do colesterol (BRIGELIUS-FLOHE, 2009). Assim, a absorção depende das secreções biliares e pancreáticas para a formação de micelas no lúmen (HUNG; SLINGER, 1982; RIGOTTI, 2007; NRC, 2011). Depois da absorção intestinal, a principal forma de transporte do tocoferol é a incorporação nos quilomicrons, de onde é transportado para o fígado, músculos e tecido adiposo (RIGOTTI, 2007). No fígado, a vitamina E pode ser excretada pelos sais biliares ou retornar para a circulação incorporada no colesterol (VLDL e LDL) e, a partir dele, depositada nos tecidos por endocitose ou troca. A proteína que transfere  $\alpha$ -tocoferol no fígado tem maior afinidade pelo RRR- $\alpha$ -tocoferol, isto tem a ver com o número de grupamentos metilas no anel cromanol e a configuração R, especialmente no carbono 2 (Figura 2) (HAMRE, 2011). Sendo assim, RRR- $\alpha$ -tocoferol é preferencialmente secretado do fígado para o sangue enquanto os demais isômeros do tocoferol são perdidos pela bile. Ainda, o  $\alpha$ -tocoferol apresenta maior atividade biológica devido ao maior índice de absorção intestinal, maior deposição nos tecidos, menor excreção fecal, além de ser oxidado mais lentamente em comparação aos demais isômeros (BRIGELIUS-FLOHE, 2009; SAMPAIO et al., 2004).

O  $\alpha$ -tocoferol é essencial para qualquer animal, seja homeotermo ou peixes, principalmente por ser um potente antioxidante biológico atuando contra os radicais livres (HUANG; HUANG, 2004). Estes radicais livres são derivados do oxigênio e nitrogênio e são produzidos no metabolismo normal como transporte de elétrons, atividade fagocítica e enzimática, processo inflamatório, uso de drogas, estresse ou problemas decorrentes da

poluição; sendo caracterizados por elementos que possuem um elétron desemparelhado que o fazem extremamente reativo com biomoléculas (ZINGG, 2007). No mecanismo de defesa contra a oxidação *in vivo* destacam-se as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, antioxidantes sintetizados endogenamente (glutathione, ubiquinona) e antioxidantes dietéticos (vitaminas C, E e carotenoides). As enzimas antioxidantes exigem íons metálicos para serem ativas, dentre eles cobre, manganês, zinco, ferro e selênio. Estes mecanismos precisam trabalhar em sincronia para evitar problemas decorrentes do processo oxidativo (HAMRE, 2011).

No processo contra a oxidação, a vitamina E posiciona-se na membrana celular, sendo a cadeia fitil na parte hidrofóbica e o anel cromanol, por ser mais polar, fica na superfície da membrana (WANG; QUINN, 2000; QUINN, 2004) (Figuras 3 e 4). Ao doar hidrogênio para o radical lipídico peroxil, a vitamina E previne o processo de oxidação dos ácidos graxos interrompendo a sequência de reações envolvidas na auto-oxidação lipídica. O radical tocoferil é, então, estabilizado por ressonância. Isto é importante em peixes, pois esta vitamina protege as membranas celulares lipoproteicas da oxidação e, assim, mantém a fluidez de membrana em baixas temperaturas (HUANG; HUANG, 2004; MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998b).

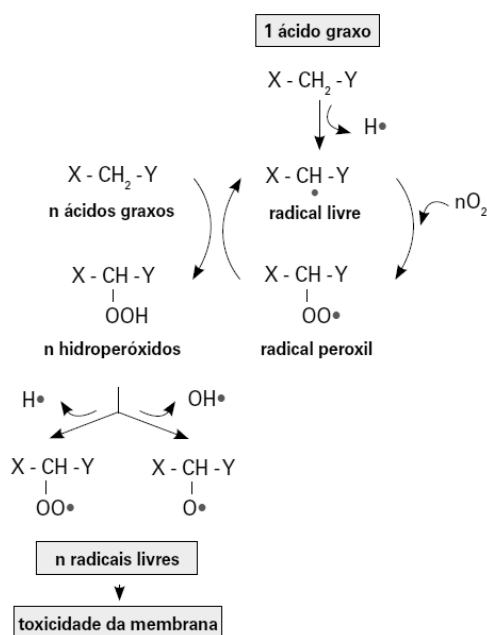


Figura 3 – Processo de auto-oxidação dos ácidos graxos



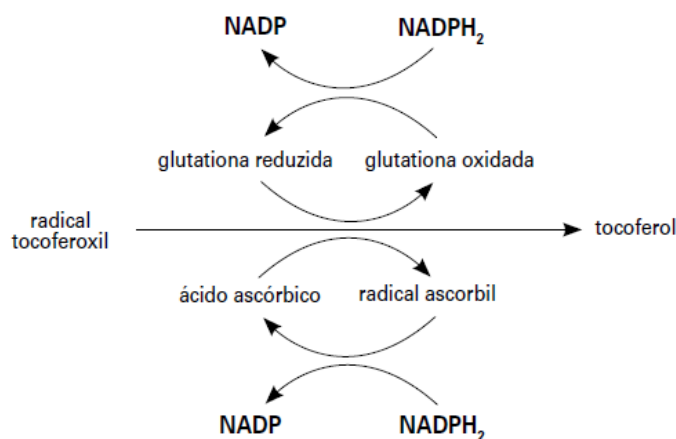


Figura 4 - Regeneração do tocoferol sob influência da enzima glutatona peroxidase e vitamina C

A manutenção da integridade da membrana celular contra os processos oxidativos, por meio da vitamina E, é importante para a modulação da resposta do sistema imune (HAMRE, 2011; TRICHET, 2010; WAAGBØ, 1994). Além disso, a importância do  $\alpha$ -tocoferol para a membrana celular é porque nela existem numerosas proteínas que exercem importantes funções, tais como histocompatibilidade a antígenos, receptores de moléculas e imunoglobulinas (MARCHALONIS, 1977<sup>2</sup> apud BLAZER; WOLKE, 1984). Em adição, durante a imunoestimulação da membrana dos linfócitos o grau de instauração é aumentado por meio da mudança na sua composição em ácidos graxos e consequente fluidez. Isto favorece o transporte ativo de substâncias estimulantes, como a linfocina, a qual estimula o crescimento e proliferação dos linfócitos. Assim, as propriedades antioxidantes do  $\alpha$ -tocoferol são necessárias para proteger estes ácidos graxos de oxidação, principalmente em momentos de imunoestimulação, quando a exigência em vitamina E pode aumentar (BLAZER; WOLKE, 1984). A membrana dos macrófagos possui também grande importância no processo de fagocitose, sendo que qualquer mudança na sua viscosidade e permeabilidade pode alterar as funções celulares interferindo também na susceptibilidade de ativação por partículas exógenas (OBACH et al., 1993). Além de estabilizar membranas biológicas, a vitamina E participa na modulação da síntese de eicosanoides (HAMRE, 2011; WANG; QUINN, 2000).

A vitamina E participa da resposta imunológica atuando na atividade bactericida. Dentre outras formas, este mecanismo ocorre com base na produção de espécies reativas de oxigênio, através de um evento que envolve o consumo de oxigênio pelo organismo (*burst*

<sup>2</sup> MARCHALONIS, J.J. The lymphocyte plasma membrane: isolation and properties of biologically relevant proteins. In: \_\_\_\_\_ **The Lymphocyte Structure and Function**. Marcel Dekkar, Inc., New York, NY, 1977. p. 373-432.

respiratório). Por exemplo, para peixe papagaio, *Oplegnathus fasciatus*, a atividade fagocítica foi melhorada proporcionalmente ao aumento dos níveis de  $\alpha$ -tocoferol dietético até 500 mg kg<sup>-1</sup> de ração (GALAZ; KIM; LEE, 2010). Efeitos semelhantes foram registrados para o “grouper” *Epinephelus malabaricus* (LIN; SHIAU, 2005), para o bagre do canal (HAMRE, 2011; YILDIRIM-AKSOY et al., 2008), para a trutas arco-íris (CLERTON et al., 2001; KIRON et al., 2004), para o “red drum” *Scianops ocellatus* (PENG; GATLIN III, 2009), para o “gilthead seabream” (SEALEY; GATLIN III, 2002; ORTUÑO et al., 2001; MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998b) e para o pacu (BELO et al., 2005). No entanto, nem sempre a suplementação dietética de vitamina E afeta a atividade fagocítica, além de altas doses (1000 mg kg<sup>-1</sup>) suprimirem a atividade imunológica, como atividade fagocítica em truta arco-íris (BLAZER; WOLKE, 1984; KIRON et al., 2004), fragilidade de eritrócitos em salmão “Coho” (*Oncorhynchus kisutch*) (HUANG; HUANG, 2004) e a habilidade em combater bactérias, bem como os níveis de proteína plasmática e de imunoglobulinas para “sunshine bass” (SEALEY; GATLIN III 2002).

Outra resposta imunológica que pode ser influenciada pela vitamina E dietética é a lisozima, como ocorreu para “grouper” (KIRON et al., 2004; LIN; SHIAU, 2005). No entanto, esta atividade não foi melhorada para truta arco-íris (GALAZ; KIM; LEE, 2010; PUANGKAEW et al., 2004) e para “sunshine bass” (SEALEY; GATLIN III, 2002). Outros efeitos positivos da vitamina E dietética no sistema imunológico de peixes já observados foram o aumento gradativo nos leucócitos e do sistema complemento para “grouper” (HAMRE, 2011; LIN; SHIAU 2005), truta arco-íris (CLERTON et al., 2001) e dourada (CUESTA et al., 2001; ORTUÑO; ESTEBAN; MESSEGUER, 2000; LIN; SHIAU, 2005). A vitamina E age, ainda, na preservação da resistência dos eritrócitos à hemólise e na manutenção da permeabilidade capilar (HALVER, 2002; ABDEL-HAMEID; ABIDI; KHAN, 2012) e do nível de globulina sérica (BLAZER; WOLKE, 1984).

Em estudos de determinação da exigência em vitamina E, deve-se considerar, além dos efeitos dose-resposta, a interação desta vitamina com outros componentes da dieta, principalmente pró-oxidantes, outros antioxidantes e a qualidade dos ácidos graxos (BLAZER; WOLKE, 1984; HUNG; CHO; SLINGER, 1980, 1981; WATANABE et al., 1981). Quanto mais insaturados e quanto mais oxidados forem os ácidos graxos dietéticos, maior a necessidade de vitamina E. Por exemplo, em experimento com tilápia híbrida, as exigências em vitamina E foram 40 e 60 mg kg<sup>-1</sup> para dietas contendo 5 % e 12 % de lipídios, respectivamente (SHIAU; SHIAU, 2001; LIN; SHIAU, 2005), e para “grouper”, de 61 e 104 mg kg<sup>-1</sup> de ração para 4 % e 9% de lipídio na dieta, respectivamente (LIN; SHIAU, 2005).

Resultados semelhantes foram registrados para “halibut” do Atlântico *Hippoglossus hippoglossus*, carpa e salmão do Atlântico (HAMRE; LIE, 1995; LEWIS-McCREA; LALL, 2007; WATANABE et al., 1981). Por isso, antioxidantes lipossolúveis precisam ser adicionados à dieta para prevenir oxidação dos lipídios e “poupar” a vitamina lipossolúvel que está sendo testada (HUNG; CHO; SLINGER, 1980; WATANABE et al., 1981), particularmente a vitamina E.

Além da influência do teor de lipídio na dieta, a exigência em vitamina E pode sofrer influência da interação com a vitamina C (HAMRE et al., 1997; LEE; DABROWSKI, 2003, 2004; YILDIRIM-AKSOY et al., 2008), astaxantina (CHRISTIANSEN et al., 1995) e/ou o selênio (BELL et al., 1985; POSTON; COMBS; LEIBOVITZ, 1976). Assim como a vitamina E, a vitamina C é essencial aos peixes, agindo como antioxidante biológico. A vitamina C participa, ainda, da regeneração da vitamina E, reduzindo os radicais oxidados de vitamina E (HAMRE, et al., 1997; WAAGBØ, 1994) (Figura 4).

Por exemplo, quando alimentado com dieta isenta em vitamina C, o bagre do canal apresentou variáveis de desempenho reduzidas, mesmo com suplementação dietética extra de vitamina E, mas sinais de deficiência em vitamina E não foram observados nos peixes alimentados com dietas isentas dessa vitamina, mas suplementadas com vitamina C (GATLIN III; POE; WILSON, 1986). Resultados similares foram registrados para o salmão do Atlântico (SEALEY; GATLIN III, 2002). A concentração hepática de vitamina C aumenta com o aumento da suplementação dietética de vitamina E para o salmão do Atlântico, indicando que existe um mecanismo poupador de uma vitamina sobre a outra (HAMRE et al., 1997). Foi relatado, ainda, que “sunshine bass” alimentados com dieta contendo 25 e 2500 mg kg<sup>-1</sup> de vitamina C mas deficiente em vitamina E, apresentam melhor eficiência alimentar e nenhum sinal de deficiência em vitamina E; a inclusão de 30 e 300 mg kg<sup>-1</sup> de vitamina E na dieta diminuiu a mortalidade no estoque de peixes que receberam dieta deficiente em vitamina C (SEALEY; GATLIN III, 2002). Esta relação entre as vitaminas E e C foi também relatada para truta-arco-íris (FRISCHKNECHT; WAHLI; MEIER, 1994) e esturjão *Acipenser fulvescens* (LEE; DABROWSKI, 2003).

No entanto, altas doses de vitamina E na dieta podem favorecer o aparecimento de sinais de deficiência de vitamina C. Por exemplo, o salmão do Atlântico alimentado com rações deficientes em vitamina C, mas com níveis de vitamina E de 300 mg kg<sup>-1</sup>, apresentaram sinais de deficiência de vitamina C mais pronunciados, como aumento de mortalidade, crescimento reduzido e do acúmulo de vitamina E no fígado (HAMRE et al., 1997). Resultado semelhante foi registrado para “turbot” *Scophthalmus maximus* (RUFF et

al., 2003). Isto poderia estar relacionado ao status do estresse oxidativo nos peixes decorrente do acúmulo de vitamina E, tendo em vista que sob altas concentrações de vitamina E e baixas concentrações de vitamina C, grande parte do tocoferol pode estar presente na forma do radical tocoferoxil, o qual não inibe a oxidação lipídica (BOWRY; INGOLD; STOCKER, 1992), ou seja, nessas condições o  $\alpha$ -tocoferol pode exercer efeito pró-oxidante em peixes, principalmente nos deficientes em vitamina C.

Outro fator que interfere na exigência em vitamina E pelos peixes é a presença de outros antioxidantes e minerais na dieta, como o selênio (ROEM; KOHLER; STICKNEY, 1990). O efeito antioxidante do selênio está relacionado à sua incorporação na glutathione peroxidase, que age nas membranas biológicas reduzindo hidroperóxidos por evitar a formação de radical alcóxil lipídico (ARTEEL; SIES, 2001; BRIGELIUS-FLOHE, 1999). O sítio ativo desta enzima contém seleniocisteína (STEINBRENNER et al., 2006). Por este motivo, existe uma interação entre selênio e vitamina E de modo que a deficiência neste mineral pode reduzir o  $\alpha$ -tocoferol tecidual (BELL et al., 1985; GATLIN III; POE; WILSON, 1986; POSTON; COMBS; LEIBOVITZ, 1976).

A exigência em vitaminas é afetada pelo tamanho, idade e taxa de crescimento, bem como por fatores ambientais e inter-relações entre nutrientes. Por este motivo existem dados de diferentes exigências para a mesma espécie. Ainda, o desempenho não deve ser a única variável avaliada na determinação de exigências nutricionais de peixes. Outras variáveis, como a acumulação de lipídios, deformidades esqueléticas, atividades de enzimas específicas, deposição de vitaminas nos tecidos, conteúdo lipídico do fígado, índice hepatossomático, grau de oxidação lipídica e respostas imunológicas, podem ser usados para quantificar as exigências em vitaminas em organismos aquáticos (NRC, 2011). Algumas espécies já têm suas exigências em vitamina E determinadas com base no desempenho (Tabela 4).

Tabela 4 - Dose ideal de vitamina E para o desempenho de várias espécies de peixes

Espécie	Dose ideal mg kg <sup>-1</sup> de ração	Referência
tilápia híbrida <i>O. niloticus x O. aureus</i>	62,5	HUANG; HUANG, 2004
tilápia do Nilo <i>O. niloticus</i>	25-50	SATOH et al., 1987 <sup>3</sup> apud ROEM; KOHLER; STICKNEY, 1990
“mrigal” <i>Cirrhinus mrigala</i>	99	PAUL; SARKAR; MOHANTY, 2004
bagre do canal <i>Ictalurus punctatus</i>	30-50	WILSON; BOWSER; POE, 1984
“rohu” <i>Labeo rohita</i>	131,91	SAU et al., 2004
“sunshine bass” <i>Morone chrysops x M. saxatilis</i>	29	KOCABAS; GATLIN, 1999
“red drum” <i>Scianps ocellatus</i>	31	PENG; GATLIN III, 2009
salmão do Atlântico <i>Salmo salar</i>	60	HAMRE; LIE, 1995
carpa comum <i>Cyprinus carpio</i>	80–300	HALVER, 2002; WATANABE et al., 1977
“rockfish” coreano <i>Sebastes schlegeli</i>	45	BAI; LEE, 1998; LIN; SHIAU, 2005
catla <i>Catla catla</i>	150	SAU et al., 2004; SINHA; SINHA, 1994
“snakehead” <i>Channa punctatus</i>	140	ABDEL-HAMEID; ABIDI; KHAN, 2012
red seabream <i>Pagrus major</i>	100	GAO et al., 2012

No entanto, apesar da vitamina E dietética poder influenciar o crescimento dos animais, vários trabalhos não relatam influência da suplementação de vitamina E na dieta nas variáveis de desempenho ou registram patologias ou sinais de deficiência associados. Os trabalhos de Cowey, Adron e Youngson (1983) com truta arco-íris, Wilson, Bowser e Poe (1984) com catfish, Huang et al. (2004) com salmão “Coho”, Lewis-McCrea e Lall (2007) com “halibut” do Atlântico e Navarro et al. (2010) com tilápia, são exemplos desta constatação.

Apesar da importância da vitamina E para o metabolismo dos peixes, o corpo de conhecimento a respeito dos efeitos das exigências e da suplementação dietética de vitamina E é ainda bastante modesto e discutível. Normalmente as quantidades exigidas para a melhora no sistema imunológico são superiores às exigências para o melhor desempenho. Por exemplo, em estudo com “mrigal” foi definida a exigência de 99 mg kg<sup>-1</sup> para o ganho de peso e 216 mg kg<sup>-1</sup> no teste de fragilidade de eritrócitos (PAUL; SARKAR; MOHANTY, 2004), mas para peixe papagaio o melhor nível de suplementação para o desempenho foi de 38 mg kg<sup>-1</sup> de ração, enquanto que para a resposta do sistema imunológico foi de 500 mg kg<sup>-1</sup> (GALAZ; KIM; LEE, 2010). Portanto, estudos de exigências e suplementação dietética de vitamina E para as várias espécies de peixes produzidos em confinamento são necessários e

<sup>3</sup> SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Requirement of Tilapia for  $\alpha$ -tocopherol. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 53: p. 119- 124, 1987.

absolutamente justificáveis. Estes estudos devem, além de considerar a interação entre os componentes da dieta, avaliar efeitos da vitamina E na deposição tecidual, considerando ainda a fase de crescimento e condições experimentais, uma vez que inúmeros fatores influenciam a necessidade desta vitamina em peixes.

### 1.6 O surubim *Pseudoplatystoma* sp.

Os Pimelodídeos do gênero *Pseudoplatystoma* são comumente chamados de surubim, pintado ou cachara (Figura 5). São espécies ictiófagas nativas da bacia do Paraná, São Francisco e Amazônica (BRITSKI; SILIMON; LOPES, 2007; CAMPOS, 2010). As excelentes características organolépticas de sua carne, assim como a ausência de espinhos intramusculares, fazem deste peixe um dos mais apreciados no Brasil, muito procurado tanto para a pesca esportiva como peixe ornamental e, mais recentemente, para piscicultura interior. Devido à grande exploração dos estoques naturais, as populações desta espécie decresceram na última década. No entanto, surubins são produzidos comercialmente em fazendas com boas taxas de crescimento, apesar de serem bastante vulneráveis e susceptíveis a doenças. Devido à falta de conhecimento das condições ótimas de manejo dos peixes e, particularmente, de suas exigências nutricionais, possivelmente a espécie seja ainda subutilizada (CAMPOS, 2010; CREPALDI et al., 2006; MIRANDA; RIBEIRO, 1997; RIBEIRO; MIRANDA, 1997).

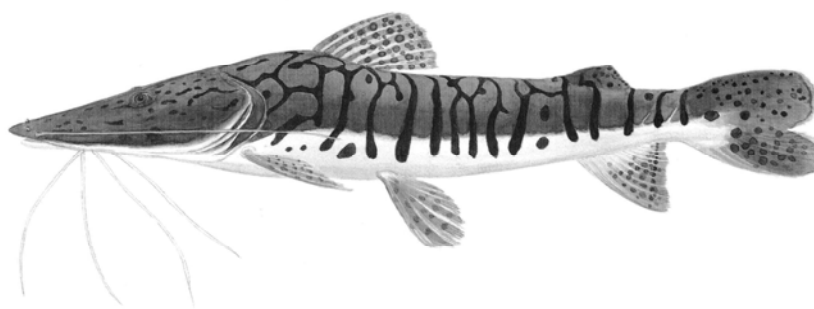


Figura 5 - Representação artística de *Pseudoplatystoma fasciatum*, reproduzido de Britski; Silimon; Lopes (2007)

## Referências

- AAKRE, R.; WERGELAND, H.I.; AASJORD, P.M.; ENDERSEN, C. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing  $\beta$ -1,3-M-glucan as adjuvant. **Fish Shellfish Immunology**, Oxford, v. 4, p. 47–61, 1994.
- ABDEL-HAMEID, N.-A.H.; ABIDI, S.F.; KHAN, M.A. Dietary vitamin E requirement for maximizing the growth, conversion efficiency, biochemical composition and haematological status of fingerling *Channa punctatus*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, p. 226-238, 2012.
- ALCORN, S.W.; PASCHO, R.J.; MURRAY, A.L.; SHEARER, K.D. Effects of ration level on immune function in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 217, p. 529-545, 2003.
- ALEXANDER, J.B.; INGRAM, G.A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, Amsterdam, v. 2, p. 249-279, 1992.
- ANDERSON, D.P. **Fish Immunology**. Neptune City:T.F.H.Publications, 1974. 239p.
- ANDERSON D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, Amsterdam, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ANDERSON, D.P.; JENEY, G. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmoniida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 34, p. 379-389, 1992.
- ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 10, p. 153–158, 2001.
- BABA, T.; WATASE, Y.; YOSHINAGA, Y. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v. 59, p. 301–307, 1993.
- BAI, S.C.; LEE, K.-J. Different levels of dietary DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, p. 405-414, 1998.
- BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and Fish Health**, New York: Haworth Press, 2001. p. 213-225.
- BASHEERA, J.M.; CHANDRAN, M.R.; ARUNA, B.V.; ANBARASU, K. Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunised with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 12, p. 201-207, 2002.

BELL, J.G.; COWEY, C.B.; ADRON, J.W.; SHANKS, A.M. Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 53, p. 149–157, 1985.

BELO, M.A.A.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; SOARES, V.E.; OTOBONI, A.M.M.B.; MORAES, J.E.R. Effect of Dietary Supplementation with Vitamin E and Stocking Density on Macrophage Recruitment and Giant Cell Formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 133, p. 146–154, 2005.

BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E. The effects of a-tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson), **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, p. 1-9, 1984.

BLAZER, V.S. Piscine Macrophage Function and Nutritional Influences: A Review. **Journal of Aquatic Animal Health**, Philadelphia, v. 3, p. 77-86, 1991.

BONAMIN, L.V.; PAULINO, C.A. Imunofarmacologia. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. p. 465-476.

BOWRY, V.W.; INGOLD, K.U.; STOCKER, R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. **Biochemical Journal**, London, v. 288, p. 341–344, 1992.

BRANDÃO, D.A. Doenças de Peixes. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 6., 1988. **Anais...** Florianópolis: ABRAQ, 1988. p. 68-73.

BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 19, p. 457-472, 2005.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 27, p. 951–965, 1999.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 46, p. 543-554, 2009.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES B.S. **Peixes do Pantanal: Manual de identificação**. 2 ed. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 2007. 227p.

CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Spix & Agassiz, 1829) e outras espécies do gênero e seus híbridos. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2.ed. Santa Maria; Editora da UFSM, 2010. p. 335-382.

CHEN, D.; AINSWORTH, A.J. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 15, p. 295–304, 1992.



CHRISTIANSEN, R.; GLETTE, J.; LIE, Ø.; TORRISSEN, O.J.; WAAGBØ, R. Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed semipurified diets with and without astaxanthin supplementation. **Journal of fish Diseases**, Oxford, v. 18, p. 317–328, 1995.

CLERTON, P.; TROUTAUD, D.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; DESCHAUX, P. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and head kidney leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 11, p. 1-13, 2001.

COLE, A.M.; LIAO, I.H.; STUHLIK, O. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 169, p. 6985-6981, 2002.

COWEY, C.B.; ADRON, J.W.; YOUNGSON, A. The vitamin e requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, p. 85-93, 1983.

CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P.; COSTA, A.A.P.; MELO, D.C.; CINTRA, A.P.R.; PRADO, S.A.; COSTA, F.A.A.; DRUMOND, M.L.; LOPES, V.E.; MORAES, V.E. Biologia reprodutiva do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 159-167, 2006.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J. Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish Shellfish Immunology**, Oxford, v. 1, p. 293– 302, 2001.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by Vitamin C. **Fish Shellfish Immunology**, Oxford, v. 13, p. 97-109, 2002.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Levamisole is a potent enhancer of gilthead sea bream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 89, p. 169–174, 2002.

CYRINO, J.E.P. URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004.533p.

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

DEMERS, N.E.; BAYNE, C.J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 21, p. 363-373, 1997.

ELLIS, A.E. The immunology of teleosts. In: ROBERTS, R.J. (Ed.). **Fish pathology**. London:Bailliere Tindall, 1989. p.135-152.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. The State of World Fisheries and **Aquaculture**. Rome: Fisheries Department, 2010. 218p.

FINDLAY, V.L.; MUNDAY, B.L. The immunomodulatory effects of levamisol on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of fish Diseases**, Oxford, v.23, p. 369–378, 2000.

FRISCHKNECHT, R.; WAHLI, T.; MEIER, W. Comparison of pathological changes due to deficiency of vitamin C, vitamin E, and combinations of vitamin C and E in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 17, p. 31–45, 1994.

GALAZ, G.B.; KIM, S.-S.; LEE, K.-J. Effects of different dietary vitamin E levels on growth performance, non-specific immune responses, and disease resistance against *Vibrio anguillarum* in Parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 23, n. 7, p. 916-923, 2010.

GAO, J.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; MAMAUAG, R.E.P.; HAN, Y. Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood for red seabream *Pagrus major*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 356-357, p. 73-79, 2012.

GATLIN III, D.M. Nutrition and fish health. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish Nutrition**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 671-702.

GATLIN III, D.M.; POE, W.E.; WILSON, R.P. Effects of stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E-deficient fingerling channel catfish **Aquaculture**, Amsterdam, v. 56, p. 187–195, 1986.

GINSBURG, I. Bactericidal cationic peptides can also function as bacteriolysis-inducing agents mimicking beta-lactam antibiotics? It is enigmatic why this concept is consistently disregarded. **Medical Hypotheses**, Amsterdam, v. 62, p. 367-374, 2004.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 179-187, 2006.

GUTENBERGER, S.K.; DUIMSTRA, J.R.; ROHOVEC, J.S.; FRYER, J.L. Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 28, p. 93–106, 1997.

HALVER, J.E. The vitamins. In: Halver, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish Nutrition**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 61-141.

HAMRE, K. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 17, p. 98-115, 2011.

HAMRE, K.; LIE, Ø. Minimum requirement of vitamin E for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at first feeding. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 26, p. 175– 184, 1995.

- HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, Ø. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 22, p. 137–149, 1997.
- HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 95, p. 201–214, 1991.
- HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. Fish health aspects in grouper aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 320, p. 1-21, 2011.
- HENKEN, A.M.; TIGCHELAAR, A.J.; Van MUISWINKEL, W.B. Effects of feeding level on antibody production in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, after injection of *Yersinia ruckeri* O-antigen. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 11, p. 85-88, 1987.
- HERMAN, R.L.; BULLOCK, G.L. *Edwardsiella tarda* as a cause of mortality in striped bass. **Transaction of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 115, p. 232-235, 1986.
- HUANG, C.; HIGGS D.A.; BALFRY, S.K.; DEVLIN, R.H. Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, New York, v. 139, p. 199–204, 2004.
- HUANG, C.; HUANG, S. Effect of dietary vitamin e on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus x O. aureus*, fed oxidized oil. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, p. 381–389, 2004.
- HUNG, S.S.O.; CHO, C.Y.; SLINGER, S.J. Measurement of oxidation in fish oils and its effect on vitamin E nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 37, p. 1248-1253, 1980.
- \_\_\_\_\_. Effect of oxidized oil, DL a-tocopheryl acetate and ethoxyquin supplementation on the vitamin E nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed practical diets. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 11, p. 648-657, 1981.
- HUNG, S.S.O.; SLINGER, S.J. Effect of dietary vitamin E on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) muscle alpha-tocopherol and storage stability. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 52, p. 119–123, 1982.
- ISPIR, Ü.; DÖRÜCÜ, M. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 29, p. 1169-1176, 2005.
- ISPIR, Ü.; YONAR, M.E. Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). **Acta Veterinaria BRNO**, Brno, v. 76, p. 493-497, 2007.
- IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 278p.
- JENEY, G.; ANDERSON, D.P. An in vitro technique for surveying immunostimulants in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 112, p. 183-187, 1993.

JORGENSEN, J.B.; SHARP, G.J.E.; SECOMES, C.J.; ROBERTSEN, B. Effect of a yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages.. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 3, p. 267–277, 1993.

KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**, Hokkaido, v. 25, p. 93-98, 1990.

KAJITA, Y.; SAKAI, M.; KOBAYASHI, M.; KAWAUCHI, H. Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 2, p. 155–157, 1992.

KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; ISHIZAKA, K.; SATOH, S.; WATANABE, T. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, p. 361-379, 2004.

KLEIN, J. **Immunology**. Cambridge:Blackwell Scientific Publications, 1990. 508p.

KOCABAS, A.M.; GATLIN III, D.M. Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female x *M. saxatilis* male). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 5, p. 3-7, 1999.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 133-141, 2006.

KUSUDA, R.; KAWAI, K. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. **Fish Pathology**, Oxford, v. 33, p. 221-227, 1998.

LANDOLT, M.L. The relationship between diet and the immune response of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 79, p. 193-206, 1989.

LEAÑO, E.M.; GUO, J.; CHANG, S.; LIAO, C. Levamisole enhances non-specific immune response of Cobia, *Rachycentron canadum*, fingerlings. **Journal of the Fisheries Society of Taiwan**, Keelung, v. 30, p. 321-330, 2004.

LEE, K.J.; DABROWSKI, K. Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). Br. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 89, p. 589–596, 2003.

\_\_\_\_\_. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 230, p. 377–389, 2004.

LEWIS-McCREA, L.M.; LALL, S.P. Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the development of skeletal abnormalities in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 262, 142-155, 2007.

LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D.M. 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**, Oxford, v. 35, p. 1380-1383, 2004.

\_\_\_\_\_. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 251, p. 201-209, 2006.

LI, G.; GUO, Y.; ZHAO, D.; QIAN, P.; SUN, J.; XIAO, C.; LIANG, L.; WANG, H. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, p. 212-217, 2006.

LIN, Y.; SHIAU, S. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 248, p. 235-244, 2005.

LOPERA, D.; ARISTIZABAL, B.H.; RESTREPO, A.; CANO, L.E.; GONZÁLEZ, A. Lysozyme plays a dual role against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, p. 169-175, 2008.

LOVELL, R.T.; OKWOCHE, V.O.; KIM, M.Y. Feed allowance and fish health. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition Fish Health**. Binghamton, NY:Food Products Press, 2001. p. 289-300.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 137-151, 2006.

MAHAJAN, C.L.; DHEER, T.R. Haematological and haematopoietic responses to starvation in an air-breathing fish *Channa punctatus* Bloch. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 22, p. 111 –123, 1983.

MAQSOOD, S.; SAMOON, M.H.; SINGH, P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 9, p. 111-120, 2009.

MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C.W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 29, p. 191-214, 2003.

MATSUO, K.; MIYAZANO, I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v. 59, p. 1377–1379, 1993.

MIRANDA, M.O.T.; RIBEIRO, L.P. Características zootécnicas do surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: Miranda, M.O.T. (Organizador). **Surubim**. Belo Horizonte, MG:Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. 1997.p. 43-56. (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos: Pesca, 19).

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. Immune response, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings fed with levamisole supplemented diets for longer duration. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 356-365, 2009.

MORRISON, R.N.; NOWAK, B.F.; CARSON, J. The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 195, p. 23-33, 2001.

MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. *In vitro* levamisole fails to increase, seabream (*Sparus aurata*) phagocyte functions. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 315-318, 1998a.

\_\_\_\_\_. Effects of *in vitro* addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 66, p. 185-199, 1998b.

MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MUÑOZ, J.; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 49-62, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC - **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington: The National Academies Press, 2011. 392p.

NAVARRO, R.D.; FERREIRA, W.M.; RIBEIRO FILHO, O.P.; VELOSO, D.P.; FONTES, D.O.; SILVA, R.F. Desempenho de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementada com vitamina E. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 59, n. 226, p. 185-194, 2010.

NG, N.K.; WANG Y.; KETCHIMENIN P.; YUEN K. Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, p. 423-437, 2004.

NISHIMURA, K.; NISHIMURA, S.; NISHI, N.; SAKAI, I.; TOKURA, S.; AZUMA, I. Immunological activity of chitin and its derivatives. **Vaccine**, London, v. 2, p. 93-98, 1984.

OBACH, A.; QUENTEL, C.; LAURENCIN, F.B. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 15, p. 175-185, 1993.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESSEGUER, J. High dietary intake of  $\alpha$ -tocopherol acetato enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v.10, v. 293-307, 2000.

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

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília:FAO, 2008. 276p.

PAUL, B.N.; SARKAR, S.; MOHANTY, S.N. Dietary vitamin E requirement of mrigal, *Cirrhinus mrigala* fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 242, p. 529–536, 2004.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de Peixes – Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1999. 311p.

PENG, L.I.; GATLIN III, D.M. Dietary vitamin E requirement of the red drum *Scianps ocellatus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.15, p. 313–319, 2009.

PERERA, H.A.C.C.; PATHIRATNE, A. Enhancement of immune responses in Indian carp, *Catla catla*, following administration of levamisole by immersion. In: BONDAD-REANTASO, M.G.; MOHAN, C.V.; CRUMLISH, M.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). **Diseases in Asian Aquaculture VI**. Fish Health Section. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society; 2008. p.129-142.

PIRHONEN, J.; SCHRECK, C.B.; GANNAM, A. Appetite of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) naturally infected with bacterial kidney disease. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 189, p. 1– 10, 2000.

POSTON, H.A.; COMBS, G.F.J.; LEIBOVITZ, L. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of *Atlantic salmon* (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 106, p. 892–904, 1976.

PUANGKAEW, J.; KIRON, V.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; SATOH S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 16, p. 25-39, 2004.

QUINN, P.J. Is the distribution of a-tocopherol in membranes consistent with its putative functions? **Biochemistry**, Moscow, v. 69, p. 58–66, 2004.

RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 4, p. 229-288, 1996.

REDDY, P.G.; FREY, R.A. Nutritional modulation of immunity in domestic food animals. **Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine**, Orlando, v. 35, p. 255–281, 1990.

RIBEIRO, L.P.; MIRANDA, M.O.T. Rendimentos de processamento do surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: Miranda, M.O.T. (Organizador). **Surubim**. Belo Horizonte: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. 1997. p. 101-112. ( Coleção Meio Ambiente, Série Estudos: Pesca, 19).

RIGOTTI, A. Absorption, transport and tissue delivery of vitamin E. **Molecular Aspects of Medicines**, Doetinchem, v.28, p. 423–436, 2007.

ROBERTS, R.J. Motile Aeromonad Septicaemia. In: INGLIS, V.; ROBERTS, R.J.; BROMAGE, N.R.(Ed.). **Bacterial disease of fish**. Oxford: Blackwell Science, 1994. p. 143-155.

ROEM, A.J.; KOHLER C.C.; STICKNEY, R.R. Vitamin E requirements of the blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner), in relation to dietary lipid level. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 87, p. 155-164, 1990.

RUFF, N.; FITZGERALD, R.D.; CROSS, T.F.; HAMRE, K.; KERRY, J.P. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 9, p. 91–103, 2003.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 41, p. 66-75, 2010.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of health and aflatoxin-induced immunocompromised carpa indiana, *Labeo rohita*. **Journal of Applied Aquaculture**, Philadelphia, v. 11, p. 15-25, 2001.

\_\_\_\_\_. The effect of dietary immunomodulation upon Edwardsiella tarda vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 12, p. 1–16, 2002.

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

SAKAI, M.; KAJITA, Y.; KOBAYASHI, M.; KAWAUCHI, H. Immunostimulating effect of growth hormone: in-vivo administration of growth hormone in rainbow trout enhances resistance to *Vibrio anguillarum* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 57, p. 147– 152, 1997.

SAKAI, M.; KOBAYASHI, M.; KAWAUCHI, H. Enhancement of chemiluminescent responses of phagocytic cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by injection of growth hormone. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 5, p. 375–379, 1995.

\_\_\_\_\_. In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v.151, p.113–118, 1996a.

\_\_\_\_\_. Mitogenic effects of growth hormone and prolactin on chum salmon *Oncorhynchus keta* leucocytes in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 53, 185–189. 1996b.

SALAS-LEITON, E.; ANGUIS, V.; MARTÍN-ANTONIO, B.; CRESPO, D.; PLANAS, J.V.; INFANTE, C.; CAÑAVATE, J.P.; MANCHADO, M. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 28, p. 296-302, 2010.

SAMPAIO, F.G.; KLEEMANN, G.K.; SÁ, M.V.C.; PEREIRA, A.S.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. 2004. Níveis de vitamina E e de selênio para pós-larvas de *Macrobrachium mazonicum*. **Acta Scientiarum. Animal Science**, Maringá, v.26, p.129-135, 2004.

SAU, S.K.; PAUL, B.N.; MOHANTA, K.N.; MOHANTY, S.N. Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of carpa indiana (*Labeo rohita*) fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 240, p. 359-368, 2004.



- SCHRECK, C. B.; MOYLE, P.B. Methods for Fish Biology. **American Fisheries Society**, Bethesda, MD, USA, 1990. 684p.
- SEALEY, W.M.; GATLIN III, D.M. 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. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, p. 748-755, 2002.
- SECOMBES, C.J.; HARDIE, L.J.; DANIELS, G. Cytokines in fish: an update. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 6, p. 291–304, 1996.
- SHEPHERD, J. Fish health and disease. In: SHEPHERD, J.; BROMAGE, N.R.(Ed.). **Intensive fish farming**. Oxford:Blackwell Science, 1992. p.198-238.
- SHERIDAN, M.A. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, New York, v. 90, p. 679-690, 1988.
- SHIAU, S.Y.; SHIAU, L.F. Reevaluation of the vitamin E requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus x O. aureus*. **Animal Science**, Cambridge, v. 72, p. 529–534, 2001.
- SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; LIM, C. Immunity and disease resistance in fish. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Food Products Press, 2001. p. 149-162.
- SINDERMAN, C.J. Mechanisms of internal defense. In: SINDERMAN, C.J.(Ed.). **Principal Diseases of Fish and Shellfish**, 2<sup>nd</sup> ed. San Diego Academic Press, 1990. v.1, p. 217-255.
- SINHA, A.; SINHA, Y.K.P. Role of vitamin E in growth of an Indian major carp, catla (*Catla catla*). **Journal of Indian Fisheries Association**, Kerala, v. 24, p. 91–96, 1994.
- SIWICKI, A.K. Immunomodulating activity of levamisole in spawners carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Fish Biology**, London, v. 31, p. 245-246, 1987.
- SIWICKI, A.K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental & Comparative Immunology**, Oxford, v.13, p. 87-91, 1989.
- SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. *In vitro* immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. **Developmental & Comparative Immunology**, Oxford, v. 13, p. 231-237, 1990.
- \_\_\_\_\_ Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 41, p.125-139, 1994.
- SIWICKI, A.K.; MIYASAKI, T.; KOMATSU, I.; MATSIZATO, T. In vitro influence of heat extract from firely squid *Watasenia scintillans* on the phagocyte and lymphocyte activities in rainbow trout. **Fish Pathology**, Hokkaido, v. 31, p. 1-7, 1996.

SIWICKI, A.K.; MORAND, M.; FULLER, F.C.; NISSEN, S.; KAZUN, K.; GLOMBSKI, E. Influence of HMB ( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate) on antibody secreting cells (ASC) after in vitro and in vivo immunization with the anti-*Yersinia ruckeri* vaccine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Research**, London, v. 32, p. 491-498, 2001.

SIWICKI, A.K.; COSSARINI-DUNIER, M. Effect of levamisole on the lymphocyte and macrophage activity in carp *Cyprinus carpio*. **Annales Recherche Vétérinaire**, London, v. 21, p. 95-100, 1990.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; DIXON, O.W. *In vitro* immunostimulant of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. **Development & Comparative Immunology**, Oxford, v. 14, p. 231-237, 1990.

SMITH, E.L.; BROWN, J.H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish Shellfish immunology**, Oxford, v. 15, p. 71-79, 2003.

SODERBERG, R.W. **Flowing water fish culture**. Boca Raton: Lewis Publishers, CRC Press, 1995. 147p.

STEINBRENNER, H.; ALILI, L.; BILGIC, E.; SIES, H.; BRENNEISEN, P. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**. Philadelphia, v. 40, p. 1513–1523, 2006.

SUNG, H.H.; KOU, G.H.; SONG, Y.L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish Pathology**, Hokkaido, v. 29, p. 11–17, 1994.

SUZUKI, K.; OKAWA, Y.; HASHIMOTO, K.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. **Microbiology and Immunology**, Richmond, v. 28, p. 903–912, 1984.

SYMOENS, I.; ROSENTHALL, M. Levamisole in the modulation of the immune responses. The current experimental and clinical state. **Journal Reticuloendothelial Society**, Bethesda, v. 21, p. 175-221, 1977.

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

TRICHET, V.V. Nutrition and immunity: an update. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, p. 356–372, 2010.

WAAGBØ, R. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: A Review. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 25, p. 175–197, 1994.

WANG, X.Y.; QUINN, P.J. The location and function of vitamin E in membranes (review). **Molecular Membrane Biology**, London, v. 17, p. 143–156, 2000.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; MATSUI, M.; OGINO, C.; KAWABATA, T. Effects of  $\alpha$ -tocopherol deficiency on carp: VII. The relationship between dietary levels of linoleate and  $\alpha$ -tocopherol requirement. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, Tokyo, v. 43, p. 935–946, 1977.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; WADA, M. Dietary lipid levels and a-tocopherol requirement of carp. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, Tokyo, v. 47, p. 935–946, 1981.

WEINBERG, E.D. Cellular regulation of iron assimilation. **The Quarterly Review of Biology**, v. 64, p. 261-290, 1989.

WIJENDRA, G.D.N.P.; PATHIRATNE, A. Evaluation of immune responses in an indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with levamisole incorporated diet. **Journal of Science - University of Kelaniya**, Kelaniya, v. 3, p. 17-28, 2007.

WILSON, R.P.; BOWSER, P.R.; POE, W.E. Dietary vitamin E requirement of fingerling channel catfish. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, p. 2053-2058, 1984.

WILSON, M.R.; WARR, G.W. Fish immunoglobulin and the genes that encode them. **Annual Review of Fish Diseases**, Amsterdam, v. 2, p. 201-221, 1992.

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

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

ZINGG, J.M. Modulation of signal transduction by vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, Doetinchem, v. 28, p. 481–506, 2007.

## 2 FARMACOCINÉTICA DO LEVAMISOL EM PINTADO *PSEUDOPLATYSTOMA CORRUSCANS*

### Resumo

O levamisol tem sido usado como imunostimulante em diferentes espécies na aquicultura. No entanto, não existem estudos relacionados à eliminação deste fármaco em peixes. Determinou-se no presente estudo o perfil farmacocinético do levamisol em pintado *Pseudoplatystoma corruscans*, após administração intramuscular. Amostras de sangue foram coletadas (n=3) dos peixes que receberam 50 mg de levamisol kg<sup>-1</sup> peso vivo nos tempos de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 12,0 horas após a injeção. Os peixes foram amostrados aleatoriamente. As concentrações do levamisol no plasma foram determinadas por HPLC-UV. A concentração plasmática máxima verificada foi de 12,79 mg L<sup>-1</sup>. Na fase de distribuição (0,5-2 horas) a constante de eliminação foi de 6,71 mg h<sup>-1</sup> e meia-vida ( $t_{1/2\alpha}$ ) de 0,10 horas, enquanto para o intervalo de eliminação (4-12 horas) a constante foi de 0,37 mg h<sup>-1</sup> e meia-vida ( $t_{1/2\beta}$ ) de 1,86 horas. O levamisol é eliminado do sangue do peixe em um período de 12 horas.

Palavras-chave: Imunostimulantes; Farmacocinética; Pintado; Eliminação

### Abstract

Levamisol has been used as immunomodulator for aquaculture species but studies about its elimination in fish are scarce. This study determines pharmacokinetic profile of levamisol in speckled surubim *Pseudoplatystoma corruscans* after intramuscular administration. Blood samples were drawn from fish (n=3) injected with 50 mg levamisol kg<sup>-1</sup> body weight at 0.25; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 6.0 e 12.0 hours after the injection; fish were sampled randomly one time. Concentrations of levamisol on plasma were determined by HPLC-UV. Maximum plasmatic concentration was 12.79 mg L<sup>-1</sup>. In the distribution phase (0.5-2 hours) a constant rate of 6.71 mg h<sup>-1</sup> and half-life ( $t_{1/2\alpha}$ ) of 0.10 hours where recorded, whilst for the elimination interval (4-12 hours), the rate was 0,37mg h<sup>-1</sup> and half-life ( $t_{1/2\beta}$ ) was 1.86 hours. Levamisol is thus shown to be completely eliminated from fish blood on a 12-h period.

Keywords: Immunomodulator; Pharmacokinetic; Withdrawal period; Surubim

### 2.1 Introdução

A intensificação dos sistemas de produção expõem os peixes a agentes estressores como má qualidade de água e elevada densidade de estocagem. Estes fatores afetam a condição fisiológica dos peixes confinados e, conseqüentemente, influenciam negativamente o sistema imune, aumentando a suscetibilidade a infecções por microrganismos (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006; SADO; BICUDO; CYRINO, 2010). Muitos fármacos

sintéticos e antibióticos são usados no tratamento de doenças em peixes. No entanto, o uso irracional de antibióticos, especialmente, pode gerar o surgimento de microrganismos resistentes a drogas, além de poderem negativamente imunossuprimir os animais e acumular no meio ambiente, gerando impacto ambiental e no próprio animal, por acumulação residual (ANDERSON, 1992; RIJKERS et al., 1980; LEWIS et al., 1980; LUNDÉN et al., 1998; MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009).

Assim como em outras áreas, medidas preventivas em aquicultura são melhores do que o uso de drogas na tentativa de controlar estes problemas (MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009). Neste contexto, o levamisol, um imidazotiazol sintético aprovado como anti-helmíntico para humanos e muitas outras espécies de mamíferos (LI; WANG; GATLIN III, 2006), vem mostrando ter propriedades imunoestimulatórias para vários animais, incluindo peixe, camarão e até o homem. O uso do levamisol como adjuvante em vacinas tem mostrado melhora na resposta do sistema imune em truta arco-íris *Onchorhynchus mykiss* (ANDERSON; JENEY, 1992) e em dourada *Sparus aurata* L. (CUESTA; MESEGUER; ESTEBAN, 2004). Adicionalmente, foi demonstrado que o levamisol melhora a resistência a bactérias patogênicas como *Vibrio anguillarum* em truta arco-íris (KAJITA et al., 1990), *Aeromonas hydrophila* em carpa *Cyprinos carpio* (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006), *Paramoeba* sp. em salmão do Atlântico *Salmo salar* (FINDLAY; MUNDAY, 2000), *Edwardsiella tarda* em carpa indiana *Labeo rohita* (SAHOO; MUKHERJEE, 2002) e *Acinetobacter lwoffii* em bagre africano *Clarias fuscus* (LI et al., 2006).

O levamisol melhora a produção de ânion superóxido e a atividade fagocítica de leucócitos em truta arco-íris (SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1990; ISPIR; YONAR, 2007). Resultados semelhantes foram obtidos para outras espécies de peixes, incluindo carpa (SIWICKI, 1989), dourada (MULERO; ESTEBAN; MESSEGUER, 1998), salmão do Atlântico (MORRISON; NOWAK; CARSON, 2001) e carpa indiana (SAHOO; MUKHERJEE, 2002).

Apesar dos resultados mostrando que o levamisol pode ser uma ferramenta útil como droga imunoestimulatória em aquicultura, os conhecimentos acerca dos parâmetros farmacocinéticos deste fármaco em peixes são ainda inexistentes. Por este motivo, esta pesquisa objetivou definir a depleção e “clearance” do levamisol em peixe após administração intramuscular, usando como espécie modelo o Siluriforme neotropical pintado *Pseudoplatystoma corruscans*.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Espécie modelo utilizada e condições experimentais

Juvenis de pintado, provenientes de piscicultura comercial, foram aclimatados às instalações do Laboratório de Nutrição de Peixes do Setor de Piscicultura da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, sendo alimentados duas vezes ao dia, por sete dias, com dieta comercial. Os peixes foram então individualmente pesados ( $390 \pm 40$  g) e estocados separadamente em 21 caixas de polietileno (80,0 L) abastecidas por um sistema fechado de recirculação de água com filtragem biológica e aeração forçada a partir de compressor radial e difusores de ar, nas seguintes condições de água: temperatura  $27 \pm 0,5$  °C; pH  $8,07 \pm 0,07$ ; oxigênio dissolvido  $6,1 \pm 0,4$ ; condutividade  $4,13 \pm 0,04$  mS  $\text{cm}^{-1}$ ; salinidade  $0,22 \pm 0,004$  %; amônia total 0,25 ppm; total de sólidos dissolvidos  $2,64 \pm 0,03$  g  $\text{L}^{-1}$ , em condições de fotoperíodo controlado, 12 horas claro e 12 horas escuro.

### 2.2.2 Estudo farmacocinético

A alimentação foi suspensa por 24 horas e cada animal recebeu uma injeção intramuscular de levamisol equivalente a 50 mg  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo. O fármaco foi diluído em 1,0 mL de solução fisiológica 0,6 %, estéril e a injeção foi feita no músculo dorsal, à altura do início da nadadeira dorsal. Após a injeção, coletaram-se amostras de sangue (1,5 mL) através de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 3,0 mL previamente umedecidas com solução de etilenodiamino tetra-acético [EDTA] (10 %) em solução salina (0,6 %). Os tempos de coleta foram 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 12,0 horas após injeção. Para cada tempo de coleta foram utilizados três peixes, sendo que cada peixe foi exsanguinado uma única vez. Em todas as etapas os peixes foram manejados sob anestesia (eugenol, 1:50.000 v/v) de maneira a recuperar o comportamento normal em 30 segundos. Após coleta, o sangue foi centrifugado a 2000 g por 15 minutos e o plasma coletado e imediatamente congelado e mantido a  $-20$  °C até ser analisado por HPLC-UV.

### 2.2.3 Reagentes químicos e procedimentos analíticos

No preparo da solução injetável, foi utilizado levamisol grau analítico, pureza  $>99$  % (Sigma - Saint Louis, MO, USA). A extração do levamisol foi feita de acordo com García e colaboradores (1990). Nesta etapa, alíquotas de 1,0 mL de plasma foram misturadas em vortex com 0,9 mL de água mais hidróxido de sódio 10 N e 5,0 mL da solução composta de éter etílico:n-hexano (8:2, v/v). A mistura foi centrifugada a 850 g por 5 minutos e a fase

orgânica separada e seca a temperatura ambiente. O resíduo foi, então, ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de fase móvel e uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  foi injetada no sistema cromatográfico.

A quantificação do levamisol plasmático foi realizada de acordo com El-Kholy e Kempainen (2003). As análises foram realizadas em sistema HPLC Dionex - Ultimate 3000 HPLC, utilizando coluna cromatográfica de fase reversa Phenomenex (Luna) C18 250 x 4,4 mm, empacotada com partícula de 5,0  $\mu\text{m}$ ; a detecção foi realizada em detector UV-VIS, comprimento de onda 225 nm. A fase móvel consistiu-se de solução de ácido acético 2 %: metanol (1:1, v:v), com fluxo de 1,0 mL  $\text{minuto}^{-1}$ , a 25  $^{\circ}\text{C}$ , todos os solventes Merck (Darmstadt, Alemanha). O limite de quantificação foi de 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o limite de detecção 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 2.2.4 Análises estatísticas e parâmetros farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando-se análise de regressão não linear e método de mínimos quadrados no programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc.). As meias-vida ( $t_{1/2}$ ) foram calculadas por meio da eq. (1). Utilizando-se o método trapezoidal, determinou-se a área sob a curva do tempo zero ao último mensurado [ $\Sigma\text{AUC}_{1-2}$  concentração plasmática x tempo; eq. (2)] a área sob a curva extrapolada ao infinito [ $\text{AUC}_{\text{last-}\infty}$ ; eq. (3)] e a [ $\text{AUC}_{\text{total}}$  eq. (4)]. Um modelo exponencial de duas fases foi usado para estudar o comportamento da concentração do levamisol no plasma do pintado em função do tempo, eq. (5) (NEWBY et al., 2006; GUÉNETTE et al. 2007; JAMBHEKAR; BREEN, 2009).

$$t_{1/2} = 0,693/K \quad (1)$$

$$\Sigma\text{AUC}_{1-2} = ((C_{p1} + C_{p2}) / 2) \times (t_2 - t_1) \quad (2)$$

$$\text{AUC}_{\text{last-}\infty} = C_{p\text{last}} / K_{\beta} \quad (3)$$

$$\text{AUC}_{\text{total}} = (\text{AUC} + \text{AUC}_{\text{last-}\infty}) \quad (4)$$

$$C_p = \alpha \exp(-K_{\alpha}t) + \beta \exp(-K_{\beta}t) \quad (5)$$

Em que:  $C_p$  é a concentração plasmática de levamisol no tempo  $t$ ;  $C_{p\text{last}}$  é a última concentração plasmática mensurada;  $\alpha$  e  $\beta$  são as inclinações nos respectivos momentos da curva;  $t$  é o tempo e  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$  são as respectivas constantes de eliminação.

### 2.3 Resultados e discussão

Os parâmetros farmacocinéticos do levamisol em pintado foram calculados usando um modelo de dois compartimentos devido ao fato da curva de eliminação ter mostrado dois diferentes momentos (Figura 6 e Tabela 5). A partir da eq. (5) e dos valores calculados obteve-se a eq. (6) que representa o modelo obtido e, conseqüentemente, o perfil farmacocinético do levamisol em pintado. Foram determinadas ambas as constantes de eliminação (K) e meias-vidas ( $t_{1/2}$ ) (Tabela 6)

$$C_p = 3,759 \exp(-0,3722.t) + 9,034 \exp(-6,717.t) \quad (6)$$

Tabela 5 - Concentração plasmática do levamisol em pintado *Pseudoplatystoma corruscans* em cada tempo de coleta, após administração única intramuscular, a 27 °C (média ± DP; n = 3)

Tempo da coleta de sangue hora	Concentração plasmática mg L <sup>-1</sup>
0,25	10,51 ± 0,100
0,5	12,79 ± 0,135
1	3,01 ± 0,738
2	2,58 ± 0,635
4	0,83 ± 0,097
6	0,65 ± 0,026
12	0,07 ± 0,004



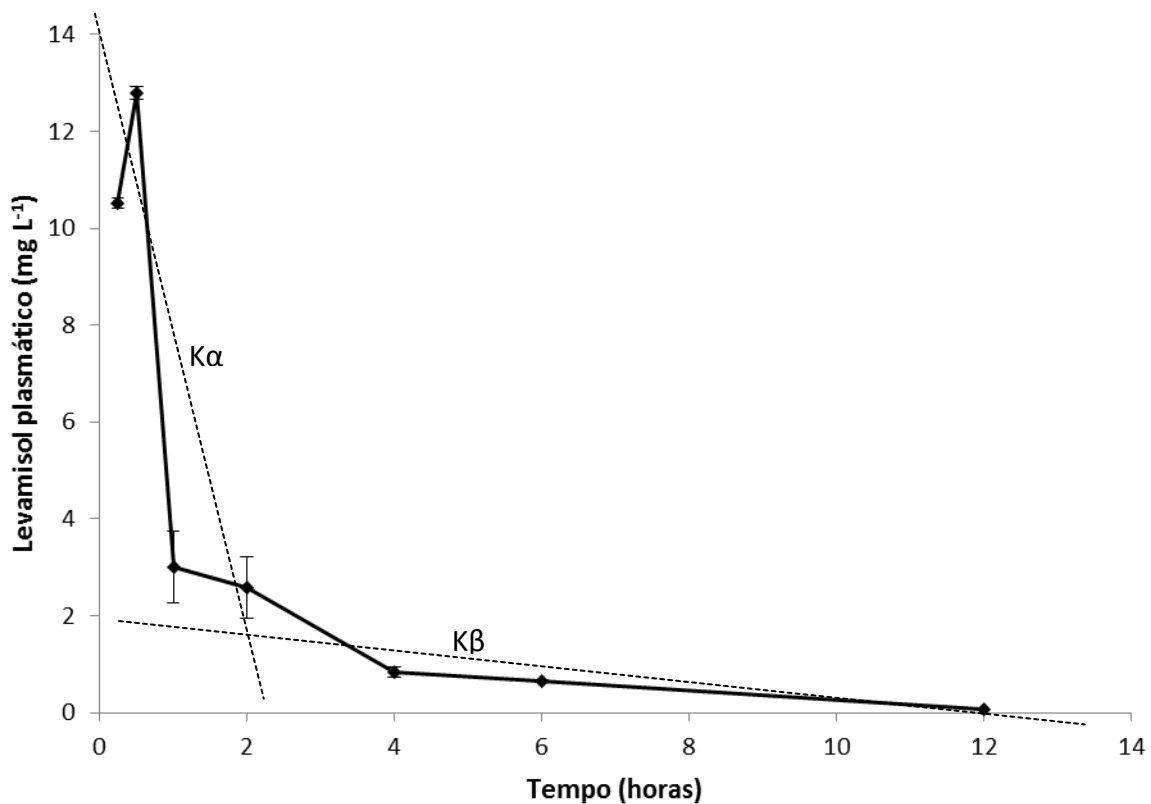
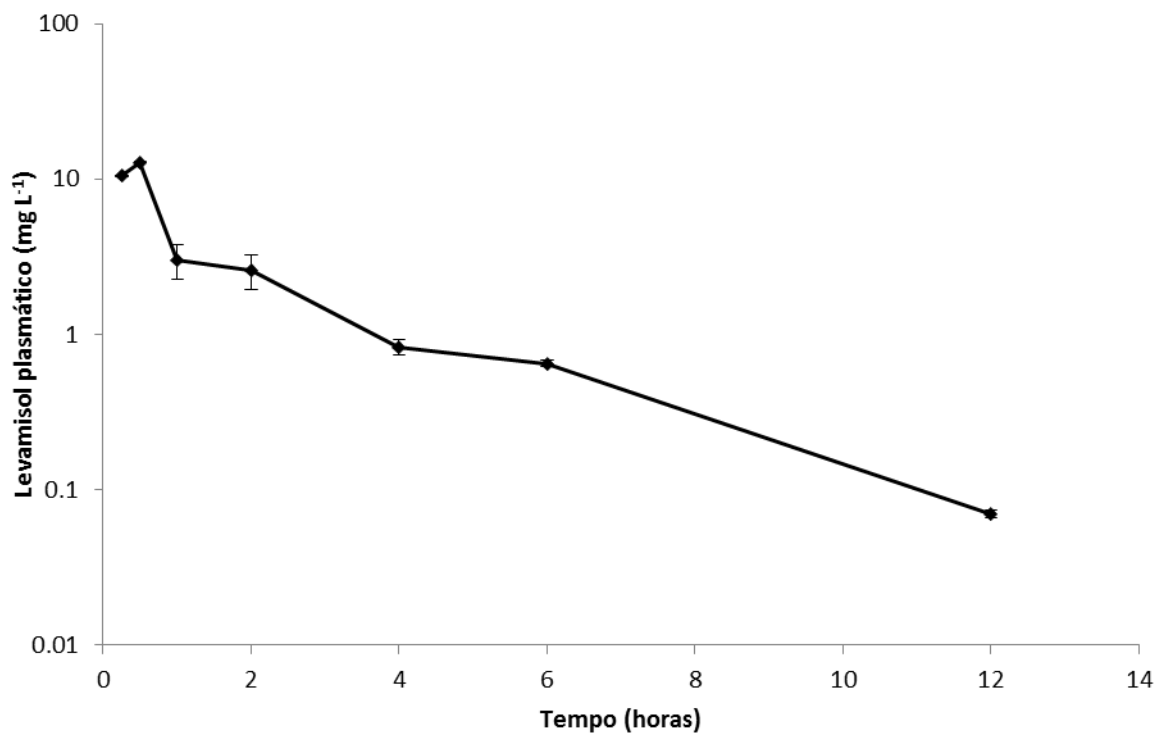


Figura 6 - Escala semi-logarítmica e linear (acima e abaixo, respectivamente) representando a média  $\pm$  DP da concentração plasmática do levamisol nos tempos selecionados, em pintado *Pseudoplatystoma corruscans* após administração intramuscular de 50 mg de levamisol

Passados 15 minutos da administração (i.m.), a droga estava ainda na fase de absorção, saindo do tecido muscular para o sangue. A concentração plasmática máxima do levamisol ( $12,79 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi verificada aos 30 minutos após a administração. Esta etapa marca o início da fase de distribuição e eliminação das drogas, ou seja, após a administração a droga é disponibilizada na corrente sanguínea e a partir de então passa a ser distribuída nos tecidos e eliminada pelo sistema excretório, por este motivo a concentração plasmática decai. Pode-se perceber que a velocidade de eliminação varia com o tempo, ou seja, à medida que a concentração plasmática de levamisol decresce, a velocidade de eliminação também diminui. Para facilitar a visualização dos parâmetros farmacocinéticos foi usado escala semi-logarítmica e linear para os valores de concentração plasmática (Figura 6).

Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos do levamisol em pintado determinados após administração intramuscular de  $50 \text{ mg}$  de levamisol  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo

Parâmetro <sup>a</sup>	Valores
$C_{\text{max}}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	12,79
$t_{\text{max}}$ (h)	0,50
$K_{\text{abs}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	6,1
$K_{\alpha}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	6,71
$K_{\beta}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,37
$t_{1/2\text{abs}}$ (h)	0,11
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,10
$t_{1/2\beta}$ (h)	1,86
$\text{AUC}_{0-\text{last}}$	17,85
$\text{AUC}_{\text{last}-\infty}$	0,46
$\text{AUC}_{0-\infty}$	18,31

<sup>a</sup> parâmetros foram obtidos usando media de três peixes por tempo de coleta.  $C_{\text{max}}$ : concentração plasmática máxima;  $t_{\text{max}}$ : tempo referente a concentração plasmática máxima;  $K_{\text{abs}}$ : constante de absorção;  $K_{\alpha}$ : constante de distribuição;  $K_{\beta}$ : constante de eliminação;  $t_{1/2\text{abs}}$ : meia-vida de absorção;  $t_{1/2\alpha}$ : meia-vida de distribuição;  $t_{1/2\beta}$ : meia-vida de eliminação; AUC: área sob a curva da concentração plasmática x tempo.

A concentração plasmática do levamisol decai rapidamente já na primeira hora, atingindo 25 % ( $3,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) da concentração máxima. A partir deste momento, o decréscimo na concentração ocorre menos acentuadamente. A determinação destas constantes de eliminação (K) possibilita entender o comportamento da curva de eliminação (Tabela 6). Existe uma fase de distribuição (0,5-2 horas) em que  $K_{\alpha} = 6,71 \text{ mg h}^{-1}$ , seguida por um período de eliminação (4-12 horas), quando  $K_{\beta} = 0,37 \text{ mg h}^{-1}$  (GUÉNETTE et al., 2007; JAMBHEKAR; BREEN, 2009). Na fase de distribuição a meia-vida ( $t_{1/2\alpha}$ ) foi de 0,10

horas; neste momento a concentração sanguínea de levamisol decresce 50 % a cada 6 min. No entanto, a meia-vida da fase de eliminação ( $t_{1/2\beta}$ ) foi calculada em 1,86 horas (Tabela 6).

Os parâmetros farmacocinéticos das drogas dependem da dosagem, via e frequência de administração (FERNÁNDEZ et al., 1998; VILLANUEVA et al., 2003). Desta forma, o ideal seria realizar comparação dos dados obtidos neste trabalho com outras espécies aquáticas que apresentassem o sistema excretório mais similar ao dos peixes, no entanto, este é o primeiro estudo mostrando farmacocinética de levamisol em peixes. Por este motivo, não se dispõe de dados para comparação e foi preciso buscar dados de outras espécies animais para contrastar com os obtidos para o pintado e melhor entender este processo farmacocinético.

A meia-vida do levamisol em pintado na fase de distribuição ( $t_{1/2\alpha} = 0,10$  h) é comparável à de coelhos que receberam injeção i.v. de levamisol  $t_{1/2\alpha} = 0,177$  h (VILLANUEVA et al., 2003); ovelhas  $t_{1/2\alpha} = 0,53$  h (i.m.) e 0,66 h (oral) (FERNÁNDEZ et al., 1998), e cabras (oral)  $t_{1/2\alpha} = 0,37$  h (SAHAGÚN et al., 2001). No entanto, o dado mais importante relacionado ao acúmulo residual é a meia-vida de eliminação. Os valores registrados para o pintado ( $t_{1/2\beta} = 1,86$  h) foram, em geral, menores do que outras espécies animais. Por exemplo, para ovelhas as meias-vida de eliminação foram 2,34 h (i.m.) e 5,44 h (oral) (FERNÁNDEZ et al., 1998); para cabras  $t_{1/2\beta} = 1,44$  h (oral) (SAHAGÚN et al., 2001); para suínos foram 9,3 e 6,9 horas após administração oral e i.m., respectivamente (GALTIER; ESCOULA; ALVINERIE, 1983); para frango  $t_{1/2}$  foi 5,7 h (EL-KHOLY et al., 2006) e para humanos, entre 4,26 e 6,0 horas (LUYCKX et al., 1982; KOUSSI et al., 1986; REID et al., 1998). Por outro lado, para coelhos as  $t_{1/2\beta}$  registradas foram de 1,42 h (VILLANUEVA et al., 2003) e 0,97 h (GARCÍA et al., 1992).

Embora dados de depleção residual na carcaça e resultados de estudos avaliando multidoses e diferentes níveis de exposição não sejam disponíveis, registra-se que o levamisol não foi detectado no sangue dos surubins 12 horas após a injeção. Como um parâmetro comparativo, o período de carência para este fármaco em ovelhas foi de 13 dias (TYRPENOU; XYLOURI-FRANGIADAKI; FRANGIADAKIS, 2007); em cabras, nove dias (BABISH et al., 1990); em suínos, 11 dias (BERGER et al., 1987), e em ovos de galinha e músculo de frango, nove e 15 dias, respectivamente (EL-KHOLY; KEMPPAINEN, 2005). Na carne bovina e leite obtidos de gado que recebeu levamisol, o período de carência é de 48 horas (BERGER et al., 1984; RUYCK et al., 2000). Estas diferenças registradas nos perfis de

eliminação podem ser atribuídas a diferenças fisiológicas e anatômicas entre as espécies animais (EL-KHOLY et al., 2006).

O funcionamento do sistema excretório dos peixes, no que diz respeito a drogas e demais compostos exógenos, é similar aos dos mamíferos. Os vertebrados, peixes inclusive, possuem rins com habilidade de excretar ativamente compostos usando um mecanismo específico de transporte tubular, além dos mecanismos hepáticos. (FORSTER, 1967<sup>4</sup> apud FORSTER; GOLDSTEIN, 1969). Além disso, os peixes possuem um mecanismo especializado para melhorar a eliminação de compostos lipofílicos para o meio aquoso externo, através das membranas epiteliais branquiais. No entanto, embora sendo muito importante para a eliminação de resíduos do metabolismo, a via branquial não é uma via eficiente para a excreção de compostos exógenos (FORSTER; GOLDSTEIN, 1969). Além disso, cada organismo possui um particular e eficiente mecanismo para lidar com diferentes características físico-químicas das drogas ou metabólitos (MAREN; EMBRY; BRODER, 1968).

Rins e fígado são responsáveis pela eliminação de compostos exógenos, em função do tamanho celular e solubilidade lipídica. As moléculas mais lipofílicas são excretadas preferencialmente pelo fígado (bile) e as mais hidrossolúveis pelos rins (PRITCHARD; BEND, 1984). Para facilitar a excreção através dos rins, o organismo converte os compostos lipofílicos em compostos de menor lipofilicidade através de transformações bioquímicas incluindo conjugação, hidroxilação aromática e glucuronização. Estas modificações dificultam a volta destas substâncias ao plasma por difusão na filtração glomerular (FORSTER; GOLDSTEIN, 1969).

As brânquias dos peixes são órgãos excretores altamente especializados e eficientes. A excreção de metabólitos como a amônia e dióxido de carbono através das brânquias é uma rota natural de baixo gasto energético, ocorrendo por simples difusão osmótica (MAREN; EMBRY; BRODER, 1968; WILKIE, 1997). Em geral, compostos lipofílicos são excretados por esta via, enquanto substâncias ionizadas e hidrofílicas são excretadas via renal e hepática, sendo as brânquias impermeáveis a estas últimas. No entanto, mesmo para compostos lipofílicos, a excreção branquial é relativamente lenta, exceto quando a solubilidade lipídica é muito alta, como ocorre com o anestésico MS 222 que é rapidamente eliminado do

---

<sup>4</sup> Forster, R.P. Osmoregulatory role of the kidney in cartilaginous fishes (Chondrichthys). In GILBERT, P.W.; MATHEWSON, R.F.; RALL, D.P. **Sharks, Skates and Rays**, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1967. p. 187-195.

organismo por esta via. Dessa forma, fica claro que as propriedades físico-químicas dos compostos interferem na sua excreção pelos peixes e, conseqüentemente, na velocidade de eliminação e meia-vida (MAREN; EMBRY; BRODER, 1968).

Em mamíferos, o levamisol se liga facilmente a proteínas plasmáticas (PLANTE; ERIAN; PETITCLERIC, 1981). Se isto também ocorresse em peixes, a sua eliminação branquial seria dificultada. Em suínos, por exemplo, esta droga é metabolizada em todos os fluídos corporais, particularmente na bile. A excreção biliar de drogas inalteradas representa somente pequenas porcentagens da dose administrada e a via que mais elimina droga é a via renal, através da urina (GALTIER; ESCOULA; ALVINERIE, 1983). Em cachorros, a maior fração do levamisol é excretada na forma inalterada pela urina, ou seja, a ligação com proteínas plasmáticas não é muito forte. Uma única passagem através dos rins remove metade do levamisol contido no plasma. Provavelmente devido à curta meia-vida do levamisol, sua biotransformação é baixa (PLANTE; ERIAN; PETITCLERIC, 1981). Como o rim dos peixes é similar ao dos mamíferos, é possível que o levamisol seja excretado por um mecanismo renal. Dessa forma, é possível dizer que em peixes o levamisol seria excretado via renal e biliar, uma explicação plausível para curta meia-vida da droga nestes animais (VAN DER BOSSCHE; JANSEES, 1967), incluindo *P. corruscans*. No entanto, cada classe de peixe é única e tem suas próprias maneiras de excretar xenobióticos. Isto implicaria em diferenças na eficiência de eliminação via biliar e urinária, o que, por sua vez, implicaria em variações no metabolismo e dados de eliminação como a meia-vida, por exemplo (PRITCHARD et al., 1980).

## 2.4 Conclusões

Os resultados desta pesquisa são importantes não só para animais aquáticos. No entanto, mais informações acerca do uso do levamisol como imunoestimulante em peixes são necessários para caracterizar sua eficácia e justificar seu uso nas mais variadas espécies cultivadas. Da mesma forma, estudos mostrando o acúmulo residual no filé e em outras espécies de peixes e animais aquáticos são importantes e necessários para uma melhor comparação dos resultados farmacocinéticos. Por fim, recomenda-se, também, que o uso do levamisol em qualquer espécie animal seja feito com cautela para evitar o surgimento de helmintos resistentes a esta droga.

## Referências

- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, Amsterdam, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ANDERSON, D.P.; JENEY, G. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmoniida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 34, p. 379-389, 1992.
- BABISH, J.G.; COLES, G.C.; TRITSCHLER, J.P.; GUTENMANN, W.H.; LISK, D.J. Toxicity and tissue residue depletion of levamisole hydrochloride in young goats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 51, p. 1126-30, 1990.
- BERGER, H.; GARCES, T.R.; FISHER, R.K.; DeLAY, R.L.; GALE, G.O.; BOYD, J.E.; SIMKINS, K.L. Efficacy, safety, and residue evaluation of levamisole gel formulation in sows. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 48, p. 852-4, 1987.
- BERGER, H.; GARCES, T.R.; WANG, G.T.; GALE, G.O.; STELLER, W.A.; SIMKINS, K.L. Anthelmintic efficacy, safety, and residue evaluation of levamisole gel formulation in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 45, p. 162-164, 1984.
- CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 101, p. 203-210, 2004.
- EL-KHOLY, H.; KEMPPAINEN, B.W. Liquid chromatographic method with ultraviolet absorbance detection for measurement of levamisole in chicken tissues, eggs and plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, 796, p. 371-377, 2003.
- \_\_\_\_\_. Levamisole Residues in Chicken Tissues and Eggs. **Poultry Science**, College Station, v. 84, p. 9-13, 2005.
- EL-KHOLY, H.; KEMPPAINEN, B.; RAVIS, W.; HOERR, F. Pharmacokinetics of levamisole in broiler breeder chickens. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy**, Chichester, v. 29, p. 49-53, 2006.
- FERNÁNDEZ, M.; GARCÍA, J.J.; SIERRA, M.; DIEZ, M.J.; TERAN, M.T. Bioavailability of levamisole after intramuscular and oral administration in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 46, p. 173-176, 1998.
- FINDLAY, V.L.; MUNDAY, B.L. The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 23, p. 369-378, 2000.
- GALTIER, P.; ESCOULA, L.; ALVINERIE, M. Pharmacokinetics of [3H] levamisole in pigs after oral and intramuscular administration. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, p. 583-587, 1983.

GARCÍA, J.J.; DIEZ, M.J.; SIERRA M.; TERÁN, T. Determination of levamisole by HPLC in plasma in the presence of heparin and pentobarbital. **Journal of Liquid Chromatography**, Philadelphia, v. 13, p. 743–749, 1990.

GARCÍA, J.J.; DIEZ, M.J.; SIERRA, M.; TERÁN, T. Pharmacokinetics of levamisole in rabbits after intravenous administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 15, p. 85–90, 1992.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 179-187, 2006.

GUÉNETTE, S.A.; UHLAND, F. C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 266, p. 262-265, 2007.

ISPIR, U.; YONAR, M.E. Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). **Acta Veterinaria Brno**, Palackeho, v. 76, p. 493-497, 2007.

FORSTER, R.P.; GOLDSTEIN, L. Formation of excretory products. In:HOAR, W.S.;RANDALL, D.J. **Fish Physiology**. v. 1: Excretion, ionic regulation, and metabolism. New York and London: Academic Press, 1969. p. 313-350.

JAMBHEKAR, S.; BREEN, P. **Basic Pharmacokinetics**. Reino Unido : Pharmaceutical Press, 2009. 407p.

KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**, Oxford, v. 25, p. 93-98, 1990.

KOUSSI, E.; GAILE, G.; LERY, L.; LARIVIERE, L.; VENIZA, M. Novel assay and pharmacokinetics of levamisole and p-hydroxylevamisole in human plasma and urine. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, Chichester, v. 7, p. 71–89, 1986.

LEWIS, J. M.; WU, C.H; BERG, H.; LEVINE, J. H. The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, Bethesda, v. 95, p. 905-928, 1980.

LI, G.; GUO, Y.; ZHAO, D.; QIAN, P.; SUN, J.; XIAO, C.; LIANG, L.; WANG, H. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, p. 212-217, 2006.

LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 251, p. 201-209, 2006.

LUNDÉN, T.; MIETTINEN, S.; LÖNNSTRÖM, L.G.; LILIUS, E.M.; BYLUND, G. Influence of oxitetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 217-230, 1998.

LUYCKX, M.; ROUSSEAU, F.; CAZIN, M.; BRUNET, C.; CAZIN, J.C.; HAGUENOER, J.M.; DEVULDER, B.; LESIEUR, I.; LESIEUR, D.; GOSSELIN, P.; ADENIS, L.; CAPPELAERE, P.; DEMAILLE, A; Pharmacokinetics of levamisole in healthy subjects and cancer patients. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Paris, v. 7, p. 247-254, 1982.

MAREN, T.H.; EMBRY, R.; BRODER, L. The excretion of drugs across the gill of the dogfish, *Squalus acanthias*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 26, p. 853-864, 1968.

MAQSOOD, S.; SAMOON, M.H.; SINGH, P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 9, p. 111-120, 2009.

MORRISON, R.N.; NOWAK, B.F.; CARSON, J. The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 195, p. 23-33, 2001.

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

NEWBY, N.C.; MENDONÇA, P.C.; GAMPERL, K.; STEVENS, E.D. Pharmacokinetics of morphine in fish: Winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and seawater-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 143, p. 275-283, 2006.

PLANTE, G.E.; ERIAN, R.; PETITCLERIC, C, Renal excretion of levamisole. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 216, p. 617-623, 1981.

PRITCHARD, J.B.; ANDERSON, J.B.; RALL, D.P.; GUARINO, A.M. Comparative hepatic and renal handling of phenol red and indocyanine green by cyclostome, elasmobranch and teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 65C, p. 99-104, 1980.

PRITCHARD, J.B.; BEND, J.R. Mechanism controlling the renal excretion of xenobiotics in fish: effects of chemical structure. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 15, p. 655-671, 1984.

REID, J.M.; KOVCH, J.S.; O'CONNELL, M.J.; BAGNIEWSKI, P.G.; MOERTEL, C.G. Clinical and pharmacokinetic studies of high-dose levamisole in combination with 5-fluorouracil in patients with advanced cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Heidelberg, v. 41, p. 477-484, 1998.

RIJKERS, G.T.; TEUNISSEN, A.G.; VAN OOSTEROM, R.; MUISWINKEL, W.B. The immune system of cyprinid fish, the immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.) **Aquaculture**, Amsterdam, v. 19, p.177-189, 1980.



RUYCK, H.; RENTERGHEN, R.; RIDDER, H.; BRABANDER, D. Determination of anthelmintic residues in milk by high performance liquid chromatography. **Food Control**, Oxford, v. 11, p. 165-173, 2000.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of World Aquaculture Society**, Hoboken, v. 41, p. 66-75, 2010.

SAHAGÚN, A.M.; TERÁN, M.T.; GARCÍA, J.J.; FERNÁNDEZ, N.; SIERRA, M.; DIEZ, M.J. Oral bioavailability of levamisole in goats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy**, Oxford, v. 24, p. 439-442, 2001.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon Edwardsiella tarda vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 12, p. 1-16, 2002.

SIWICKI, A.K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental & Comparative Immunology**, Oxford, v. 13, p. 87-91, 1989.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. *In vitro* immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. **Developmental & Comparative Immunology**, Oxford, v. 13, p. 231-237, 1990.

TYRPENOU, A.E.; XYLOURI-FRANGIADAKI, E.M.; FRANGIADAKIS, M.G. Tissue distribution and depletion of levamisole in sheep tissues. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, Athens, v. 58, p. 11-21, 2007.

VAN DER BOSSCHE, H.; JANSEES, P.A.J. The biochemical mechanism of action of the anthelmintic drug tetramisole. **Life Sciences**, Philadelphia, v. 6, p. 1781-1792, 1967.

VILLANUEVA, I.; DIEZ, M.J.; GARCÍA, J.J.; FERNÁNDEZ, N.; SAHAGÚN A.M.; SIERRA, A.; SIERRA, N. Effect of first-pass hepatic metabolism on the disposition of levamisole after intravenous administration in rabbits. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 64, p. 1283-1287, 2003.

WILKIE, M.P. Review: Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology**, Philadelphia, v. 11, p. 39-50, 1997.

### 3 LEVAMISOL DIETÉTICO COMO IMUNOESTIMULANTE PARA O CACHARA *PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM*

#### Resumo

O contínuo estresse influencia negativamente o sistema imune de peixes em confinamento, aumentando a susceptibilidade a doenças. Neste contexto, prevenir doenças é melhor que medicar os animais, o que torna o uso de imunostimulantes mais interessante do que o controle de enfermidades com uso de antibióticos. Este estudo avaliou o efeito do levamisol dietético nas variáveis de desempenho e imunológicas no cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos – 0,0; 50; 100; 200; 300 e 500 mg de levamisol por quilo de ração (n=3) – que foram fornecidos até saciedade aparente, duas vezes por dia por 60 dias a juvenis de cachara ( $77,68 \pm 2,5$  g;  $20,85 \pm 0,71$  cm), aleatoriamente estocados em 18 caixas plásticas (300 L; 10 peixes por caixa). O levamisol não afetou as variáveis de desempenho dos animais, bem como a concentração de proteínas totais, albumina e globulinas séricas, o *burst* respiratório e a proliferação de leucócitos. No entanto, o levamisol dietético afetou a atividade e a concentração de lisozima sérica, sendo que o melhor resultado foi observado para a concentração de levamisol de 247 mg kg<sup>-1</sup> de ração, ou seja, o levamisol afetou positivamente a resposta imunológica inespecífica do cachara.

Palavras-chave: Cachara; Imunostimulante; Levamisol; Aquicultura

#### Abstract

Continuous stress negatively affects the immune system of farmed fish, increasing susceptibility to diseases. In such a context, preventive measures, such as the administration of immunostimulants, are better suited for diseases control than using drugs and chemicals as remedies. This study evaluates effects of dietary levamisole on growth and immunological parameters response of striped surubim, *Pseudoplatystoma fasciatum*. Trial was set up in a completely randomized design with six treatments – 0.0; 50; 100; 200; 300 and 500 mg levamisole per kg of feed (n=3) – fed to juvenile striped surubim ( $77.68 \pm 2.5$  g;  $20.85 \pm 0.71$  cm) randomly stocked in 18 plastic tanks (300 L; 10 fish per tank) and fed until apparent satiation, twice a day, for 60 days. No differences in growth parameters were recorded. Dietary levamisole did not affect serum protein, albumin and globulins, as well as leukocyte respiratory *burst* activity (NBT) and leukocyte proliferation. However, dietary levamisole affected lysozyme activity and lysozyme concentration, the best effects recorded for fish fed 247 mg levamisole per kg of feed, that is, levamisole positively affected innate immune system of striped surubim.

Keywords: Immunomodulation; Levamisole; Striped surubim; Aquaculture

#### 3.1 Introdução

A produção da aquicultura mundial está em ascensão e por isso precisa se tornar mais eficiente e sustentável, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental. Como

consequência, a produção animal necessita de avanços tecnológicos substanciais nas áreas de melhoramento genético, manejo, sanidade e nutrição (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008). Com o constante crescimento da atividade e perspectiva positiva nos próximos 30 anos, prevê-se uma intensificação ainda maior dos sistemas de produção de peixes, i.e., produzir maior quantidade de indivíduos no menor volume de água possível (FAO, 2010).

No entanto, à medida que se intensifica a forma de produção de uma espécie qualquer, aumentam as chances da ocorrência de surtos epizooticos no plantel, acarretando em grandes perdas econômicas como decorrência da elevada densidade populacional (SODERBERG, 1995). Além disso, os animais são submetidos a diversos procedimentos inerentes ao manejo da produção como transporte, desinfecção, reprodução artificial, etc., os quais impõem certo nível de estresse com reflexos em sua homeostasia, ocasionando maior sensibilidade e, como consequência, menor resistência às enfermidades, principalmente aos patógenos secundários (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1999; SAKAI, 1999; KUSUDA; KAWAI, 1998). Uma vez instalada a infecção, muito trabalho e tempo são perdidos na tentativa de eliminar o agente patogênico do sistema de produção. Em adição, peixes resistentes infectados podem tornar-se fonte de infecção – vetores sadios – e de dispersão do agente etiológico no ambiente (KUSUDA; KAWAI, 1998).

Para evitar essas epizootias, a prevenção das doenças parece ser mais vantajosa que o tratamento medicamentoso (MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009), principalmente pelo fato de que o uso constante e indevido de medicamentos específicos, como antibióticos, pode gerar cepas resistentes e mais patogênicas (LEWIS et al., 1980), imunossuprimir os animais e estabelecer efeito cumulativo no próprio animal e meio ambiente, gerando impacto ambiental (ANDERSON, 1992; RIJKERS et al., 1980; LUNDÉN et al., 1998; MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009). A vacinação tem potencial para ser o método mais eficaz para controle das enfermidades em peixes, mas ainda é uma área em desenvolvimento (SAKAI, 1999; HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011). Nesse contexto e de modo ideal, trabalha-se com profilaxia, i.e., evita-se a necessidade de tratamento medicamentoso mantendo um ambiente saudável, ou dando aos animais a capacidade de combater os agentes patogênicos *per se*, mesmo em condições de ambientes degradados, por meio do estímulo de suas funções imunológicas.

Pesquisas mostrando interações entre dieta e imunidade na busca da manutenção ou melhora da saúde dos peixes se destacam na área de nutrição de peixes, principalmente relacionado ao uso de probióticos, prebióticos e outros imunoestimulantes (LI et al., 2006). Os imunoestimulantes são substâncias utilizadas para estimular a função de defesa do organismo

e estudos hematológicos e bioquímicos são comumente utilizados como ferramentas ou indicadores do estado funcional do sistema imunológico (SCHRECK; MOYLE, 1990).

O fármaco levamisol, um imidazotiazol sintético aprovado como anti-helmíntico para humanos e muitas outras espécies de mamíferos (LI; WANG; GATLIN III, 2006), tem propriedades imunoestimulatórias para vários animais, incluindo peixes, crustáceos e mesmo o homem. O uso do levamisol como adjuvante em vacinas aumenta os níveis de anticorpos circulantes e melhora a resposta destes anticorpos e de parâmetros do sistema imune não específico em truta arco-íris *Onchorhynchus mykiss* (ANDERSON; JENEY, 1992). Ainda, a suplementação dietética de levamisol melhorou a resistência a bactérias patogênicas como *Vibrio anguillarum* em truta arco-íris (KAJITA et al., 1990), *Aeromonas hydrophila* em carpa *Cyprinus carpio* (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006), *Paramoeba* sp. em salmão do Atlântico *Salmo salar* (FINDLAY; MUNDAY, 2000), *Edwardsiella tarda* em carpa indiana *Labeo rohita* (SAHOO; MUKHERJEE, 2002) e *Acinetobacter lwoffii* em bagre africano *Clarias fuscus* (LI et al., 2006a).

Foi demonstrado, ainda, que o levamisol melhora a produção de ânion superóxido e atividade fagocítica de leucócitos de truta arco-íris (SIWICKI et al., 1990; ISPIR; YONAR, 2007). Resultados semelhantes foram obtidos para outras espécies de peixes, incluindo carpa (SIWICKI, 1989), a dourada *Sparus auratus* (MULERO et al., 1998), o salmão do Atlântico (MORRISON; NOWAK; CARSON, 2001) e a carpa indiana (SAHOO; MUKHERJEE, 2002).

O presente trabalho propõe estudar formas de prevenção de doenças em peixes através do uso do imunoestimulante dietético levamisol e, ao mesmo tempo, elucidar questões a respeito do funcionamento do sistema imunológico do cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*, espécie nativa do Rio Paraná, Rio Uruguai e Rio São Francisco e que pode alcançar na natureza até 20 kg de peso vivo. As excelentes características organolépticas de sua carne, assim como a ausência de espinhos intramusculares, fazem deste peixe uma das espécies neotropicais mais apreciadas na pesca esportiva bem como um dos melhores candidatos à produção intensiva em piscicultura interior (BUITRAGO-SUÁREZ; BURR, 2007; CAMPOS, 2010).

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Peixes e condições experimentais

O experimento foi realizado em um sistema de recirculação de água, com fotoperíodo controlado (12/12 horas) e aeração mecânica. Juvenis de cachara ( $77,68 \pm 2,5$  g;  $20,85 \pm 0,71$  cm) provenientes de piscicultura comercial (Campo Grande, MS, Brasil) foram alojados em 18 caixas de polietileno (300 L; n=10) em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (n=3). Em todas as etapas de manejo os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína ( $50,0$  mg L<sup>-1</sup>). Diariamente monitorou-se a temperatura ( $27,5 \pm 0,96$  °C), pH ( $7,65 \pm 0,06$ ), oxigênio dissolvido ( $6,1 \pm 0,4$  mg L<sup>-1</sup>), sólidos totais dissolvidos ( $1,64 \pm 0,05$  g L<sup>-1</sup>), condutividade ( $2,56 \pm 0,08$  mS cm<sup>-1</sup>) e salinidade ( $0,13 \pm 0,006$  %) do sistema (sonda Horiba U-52). Semanalmente foi monitorada a concentração de amônia total (< 0,25 ppm), bem como realizada limpeza dos tanques por sifonamento e a remoção de matéria orgânica acumulada.

### 3.2.2 Dieta experimental

A ração experimental (42,03 % proteína bruta; 4280 kcal kg<sup>-1</sup> energia bruta; Tabela 7) foi suplementada com levamisol (>99%; Sigma Chemical - Saint Louis, MO, USA) nas quantidades de 0; 50; 100; 200; 300 e 500 mg kg<sup>-1</sup> de ração e extrusada (extrusora Inbramaq PQ-30). As dietas foram mantidas refrigeradas durante todo o período experimental. Os peixes foram alimentados *ad libitum* por 60 dias em duas refeições diárias (05h30m e 20h00m). No período de aclimatação, os animais receberam a dieta controle por sete dias.

Tabela 7 - Composição da dieta basal (controle)

<b>Ingredientes</b>	<b>Inclusão %</b>
Farinha de peixe	55,47
Farinha de vísceras	14,08
Farelo de soja	6,04
Milho moído	5,7
Amido	14,0
Premix mineral e vitamínico <sup>1</sup>	1,0
BHT	0,02
Óleo de peixe	3,7
<b>Total</b>	<b>100,0</b>

<sup>1</sup> Premix mineral (Agrocere®) por kg de produto: Fe 100.000 mg; Cu 15.000 mg; Zn 150.000 mg; I 4.500 mg; Mn 60.000 mg; Se 400 mg e Co 2.000 mg; vit. A 6.000.000 UI; vit. D3 2.250.000 UI; vit. E 75.000 mg; vit. K 3.000 mg; tiamina (B1) 5.000 mg; riboflavina (B2) 10.000 mg; niacina 30.000 mg; piridoxina 8.000 mg; ácido pantotênico 30.000 mg; biotina 2.000 mg; ácido fólico 3.000 mg; cobalamina 20.000 mg e ácido ascórbico (vit. C) 192.500 mg.

### 3.2.3 Avaliação das variáveis de desempenho

Ao final dos experimentos foram avaliadas as seguintes variáveis de desempenho:

- Ganho de peso

$$GP = [(peso\ final) - (peso\ inicial)]$$

- Consumo de ração

- Conversão alimentar

$$CA = [(consumo\ de\ ração) \div (ganho\ de\ peso)]$$

- Taxa de crescimento específico

$$TCE = \{100 \times [(\ln\ peso\ final - \ln\ peso\ inicial) \div período]\}$$

### 3.2.4 Respostas imunológicas

Ao final o período de alimentação foi coletado sangue de três animais, amostrados aleatoriamente de cada repetição. A coleta foi feita por punção do vaso caudal usando-se seringas e agulhas descartáveis, sem anticoagulante. O sangue foi imediatamente separado em dois tubos tipo “Eppendorf”, um contendo anticoagulante (heparina, 10 µL) para ser utilizado

na análise de atividade respiratória dos leucócitos a partir do sangue total, e outro sem anticoagulante, para obtenção do soro para as análises de proteína total e albumina sérica e concentração de lisozima sérica.

#### Concentração de proteínas totais, albumina e globulinas séricas

O soro foi obtido por centrifugação (2100 g, 5 minutos) e a proteína total e a albumina foram quantificadas por kits de ensaios colorimétricos (Bioclin®, Belo Horizonte - MG). A concentração total de globulinas no soro foi determinada pelo método indireto: diferença entre a concentração de proteína total e albumina.

#### Concentração de lisozima

A concentração de lisozima sérica foi determinada por meio de ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) com adaptação de Abreu (2007). As amostras de soro foram submetidas a tratamento térmico (56 °C por 30 minutos) para desnaturação e inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* seja provocada exclusivamente por ação da lisozima.

Em cubeta de 1,0 mL foram adicionados 150 µL de soro e 150 µL de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH 6,2). Após dois minutos de incubação a 26 °C, adicionou-se 300 µL da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg mL<sup>-1</sup>). A redução da densidade óptica ( $\Delta_{DO}$ ; 450 nm) foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 26 °C (espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan, com controlador de temperatura). Os resultados da atividade de lisozima foram expressos em unidade [U] mL<sup>-1</sup> de soro. A concentração de lisozima nas amostras foi determinada com o uso da equação da reta obtida na curva de calibração usando leitura de concentrações de lisozima padrão (L 6876, Sigma - Saint Louis, MO, USA).

#### Explosão respiratória

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada de acordo com Anderson e Siwicki (1995). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio produzidos no *burst* oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* [NBT] que forma um precipitado com coloração azul escuro no interior dos fagócitos, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990). Uma alíquota de 0,1 mL do sangue total foi homogeneizada com 0,1 mL de solução de NBT 0,2 % (Sigma, St Louis, MO, USA). A solução foi incubada por 30 minutos a 25 °C; em seguida, 50 µL da suspensão homogeneizada foi dissolvido em 1,0 mL de N, N-dimetil formamida (DMF;

Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 minutos. Após a lise da parede celular dos leucócitos pelo DMF, com conseqüente solubilização dos grânulos de *formazan* e liberação do corante NBT reduzido para a solução, foi determinada absorvância em espectrofotômetro ( $\lambda=540$  nm).

#### Resposta proliferativa celular leucocitária

O ensaio de cultura leucocitária seguiu metodologia descrita por Bownik (2006) e Sakai et al. (1996). Dois peixes foram amostrados aleatoriamente por repetição e exsanguinados por punção do vaso caudal utilizando-se seringas heparinizadas. O sangue obtido (1,0 mL) foi misturado com 5,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma - Saint Louis, MO, USA) em condições assépticas.

O sangue diluído foi depositado sobre 3,0 mL de solução gradiente – reagente ficoll histopaque (Sigma - Saint Louis, MO, USA) – e os leucócitos foram isolados por centrifugação, (1930 g, 30 minutos, 22 °C). A “nuvem de leucócitos” foi coletada e “lavada” três vezes com meio de cultura e a viabilidade das células avaliada com o reagente *trypan blue* 0,4 % (Sigma; Saint Louis, MO, USA). As células foram suspendidas em meio de cultura a uma concentração de  $2,5 \times 10^6$  células viáveis por mL. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 contendo 10 % de soro fetal bovino (Sigma; Saint Louis, MO, USA), 2,0 mM de L-glutamina, 1 % de tampão HEPES e 1 % de solução estreptomomicina e penicilina (Sigma; Saint Louis, MO, USA). A incubação foi conduzida em placas de 96 poços (Corning Costar Co.; Cambridge, MA, USA). Em cada poço foi adicionado 50  $\mu$ L de suspensão de células e como estimulador de multiplicação dos linfócitos B foi utilizado o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS; Sigma; Saint Louis, MO, USA) na concentração de  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; as células foram incubadas por 72 horas a 25 °C. Cada amostra foi testada em triplicata.

A proliferação e a sobrevivência celular foram analisadas por ensaio colorimétrico utilizando-se o reagente 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma - Saint Louis, MO, USA). Para tanto, 50  $\mu$ L de solução de MTT ( $5\text{mg mL}^{-1}$ , em meio de cultura) foi adicionado a cada poço e a placa foi agitada por 5 minutos, incubada por 4 horas e centrifugada a 2200 g por 10 minutos. Após remoção do sobrenadante foi adicionado sobre as células de cada poço 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma; Saint Louis, MO, USA). A placa foi agitada por 15 minutos e lida em leitor de microplaca Elisa (HZ Thermo Scientific Elisa) a 620 nm.



### **3.2.5 Análises estatísticas**

Foi realizada análise exploratória dos dados para verificação das regras necessárias à realização da análise de variância (ANOVA). Como os dados apresentaram heterogeneidade de variâncias, foi feito agrupamento das variâncias semelhantes e, então, os dados foram submetidos à ANOVA ( $\alpha=0,05$ ). Detectado efeito significativo, foi feita análise de regressão para determinação do nível ótimo de inclusão considerando-se as variáveis de desempenho e imunologia. Todas as análises foram realizadas em aplicativo SAS, versão 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### **3.3 Resultados e discussão**

O crescimento e a resistência a doenças são as duas preocupações primárias em aquicultura (LI; WANG; GATLIN III, 2006). Vários autores já relataram efeitos positivos do levamisol dietético na melhora no desempenho de animais, tanto aquáticos como terrestres (CABAJ et al., 1995; CUESTA; MESSEGUER, 2002; LI et al., 2006). No entanto, neste trabalho não foram registrados efeitos significativos da inclusão de levamisol na dieta nas variáveis de desempenho do cachara ( $p>0,05$ ) (Tabela 8). As variáveis proteínas totais, albumina e globulina sérica do cachara também não foram afetadas pela inclusão de levamisol na dieta, mas houve efeito positivo do levamisol dietético sobre a atividade e a concentração de lisozima sérica, ou seja, o levamisol dietético afetou positivamente a resposta imunológica inespecífica do cachara (Tabela 9).

Tabela 8 - Variáveis de desempenho do cachara após 60 dias com uso de níveis de levamisol (média ± DP).

Dose de levamisol	Peso inicial	Peso final	Ganho de peso	Taxa Cresc. Específico	Consumo de ração	Conversão alimentar
mg kg <sup>-1</sup>	----- g -----			% dia <sup>-1</sup>	g	
0	77,15 ± 0,919	180,90 ± 0,566	103,75 ± 1,485	1,42 ± 0,028	119,03 ± 2,015	1,15 ± 0,035
50	77,10 ± 0,520	182,63 ± 11,585	105,53 ± 12,055	1,44 ± 0,116	120,65 ± 8,309	1,15 ± 0,056
100	77,97 ± 0,961	196,10 ± 6,358	118,13 ± 7,317	1,53 ± 0,076	127,95 ± 3,065	1,08 ± 0,042
200	77,94 ± 1,108	187,77 ± 6,679	109,82 ± 7,771	1,46 ± 0,085	120,90 ± 11,527	1,10 ± 0,075
300	78,33 ± 0,551	187,40 ± 10,139	109,07 ± 10,269	1,45 ± 0,096	129,41 ± 6,004	1,19 ± 0,076
500	77,57 ± 0,777	176,28 ± 3,933	98,71 ± 4,694	1,37 ± 0,050	119,86 ± 7,064	1,17 ± 0,042

Tabela 9 - Variáveis imunológicas do cachara após 60 dias de alimentação com níveis de levamisol (média ± DP).

Dose de levamisol	Proteína	Albumina	Globulinas	Burst oxidativo	Ativ. Lisozima	Conc. lisozima	Cult. leucócitos
(mg kg <sup>-1</sup> ração)	----- mg dL <sup>-1</sup> -----			Abs. 540 nm	U mL <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>	Abs. 620 nm
0	4,04 ± 0,624	1,63 ± 0,435	2,41 ± 0,189	0,625 ± 0,041	170,34 ± 10,37 <sup>a</sup>	0,647 ± 0,036 <sup>a</sup>	0,278 ± 0,023
50	4,08 ± 0,577	1,19 ± 0,091	2,89 ± 0,667	0,601 ± 0,022	204,44 ± 19,26 <sup>ab</sup>	0,772 ± 0,070 <sup>ab</sup>	0,330 ± 0,082
100	4,85 ± 0,810	1,41 ± 0,076	3,44 ± 0,881	0,598 ± 0,012	194,07 ± 14,81 <sup>ab</sup>	0,733 ± 0,054 <sup>ab</sup>	0,329 ± 0,155
200	4,00 ± 0,217	1,25 ± 0,242	2,75 ± 0,370	0,604 ± 0,018	177,78 ± 1,48 <sup>a</sup>	0,670 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,240 ± 0,116
300	4,07 ± 0,632	1,25 ± 0,057	2,83 ± 0,591	0,593 ± 0,030	217,78 ± 8,89 <sup>b</sup>	0,822 ± 0,031 <sup>b</sup>	0,226 ± 0,034
500	4,20 ± 0,298	1,18 ± 0,260	3,02 ± 0,051	0,587 ± 0,042	173,33 ± 8,89 <sup>a</sup>	0,656 ± 0,034 <sup>a</sup>	0,255 ± 0,079

### 3.3.1 Variáveis de desempenho

Existem relatos de efeitos positivos do levamisol dietético no desempenho de peixes marinhos ou de águas interiores em vários sistemas de piscicultura (Tabela 10). Por exemplo, juvenis de carpa *Cyprinus carpio* alimentados com dietas suplementadas com levamisol na dose de 250 mg kg<sup>-1</sup> de ração apresentaram desempenho superior aos 30 dias do período alimentar (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006), o mesmo acontecendo com juvenis de dourada dez semanas após alimentação por 10 dias com dieta contendo levamisol na concentração 125 mg kg<sup>-1</sup> de ração, sendo o desempenho 10 % maior do que o grupo controle (MULERO et al., 1998). Ainda, “sunshine bass” (*Morone chrysops* ♀ × ♂ *Morone saxatilis*) alimentados com dietas contendo 100 ou 250 mg kg<sup>-1</sup>, por três semanas, apresentaram 5 % de melhora no ganho de peso e eficiência alimentar (LI; WANG; GATLIN III, 2006).

No entanto, o presente trabalho corrobora com resultados de outros estudos que demonstram que nem sempre a suplementação dietética de levamisol afeta positivamente o desempenho dos peixes. Por exemplo, Sado, Bicudo e Cyrino (2010) não registraram aumento no ganho de peso de pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados por 30 dias com dieta contendo níveis de levamisol entre 0,0 e 800,0 mg kg<sup>-1</sup>, e mais 15 dias com dieta controle. E, para o “sunshine bass” tratados com levamisol na dose de 500 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>, foram constatados sinais crônicos de toxicidade como crescimento reduzido, diminuição do consumo e da eficiência alimentar (LI; WANG; GATLIN III, 2004; LI et al., 2006; LI; WANG; GATLIN III, 2006). Em contrapartida, estas mesmas doses após duas semanas de alimentação para juvenis de beijupirá, *Rachycentron canadum*, resultaram em maior ganho de peso, porém não significativamente diferente daquele dos peixes alimentados com dietas isentas do produto. Entretanto, mesmo os peixes alimentados com as doses mais altas do fármaco não apresentaram quaisquer sinais de toxicidade (LEAÑO et al., 2004).

Tabela 10 - Atividade imunoestimulatória do levamisol dietético em peixes

Espécie	Via	Dose testada	Tempo de tratamento	Verificação da atividade	Dose ideal		Variáveis		Referência
					desempenho	imunológica	atividade	não atividade	
Dourada <i>Sparus aurata</i>	oral	0-500 mg kg <sup>-1</sup> ração	10 dias	após 5 semanas	125 mg kg <sup>-1</sup> ração	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i>		MULERO et al., 1998
“sunshine bass” ( <i>M. chrysops</i> ♀ x ♂ <i>M. saxatilis</i> )	oral	0-1000 mg kg <sup>-1</sup> ração	21 dias	21º dia	100 mg kg <sup>-1</sup> ração	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i>	lisozima	LI; WANG; GATLIN III, 2006
Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	oral	0-500 mg kg <sup>-1</sup> ração	70 dias	57º e 70º dias	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i> e lisozima		MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009
“Rohu” <i>Labeo rohita</i>	oral	5 mg kg <sup>-1</sup> corpóreo	60 dias, a cada 3 dias	60º dia	-	5 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i> e lisozima	proteína e albumina	SAHOO; MUKHERJEE, 2001
Carpa	oral	5 mg kg <sup>-1</sup> corpóreo	15 dias, a cada 3 dias	1, 2, 4, 8, 12 semanas após a última administração	-	5 mg kg <sup>-1</sup> ração	<i>burst</i> (2 -8 semanas), lisozima (4-12 semanas)		SIWICKI, 1989
Bagre africano <i>Clarias fuscus</i>	oral	0-600 mg kg <sup>-1</sup> ração	7 dias	0, 2, 4, 6, e 8 semanas após a última administração	-	150-300 mg kg <sup>-1</sup> ração	lisozima	proliferação de leucócitos	LI et al., 2006
Carpa	oral	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	90 dias	30º, 60º e 90º dia	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	250 mg kg <sup>-1</sup> ração	lisozima e <i>burst</i> (30º dia)		GOPALAKANNAN; ARUL, 2006
Beijupirá <i>Rachycentron canadum</i>	oral	0, 500 e 1000 mg kg <sup>-1</sup> ração	14 dias	14º dia	-	1000 mg kg <sup>-1</sup> ração	atividade fagocítica e <i>burst</i>	lisozima	GOPALAKANNAN; ARUL, 2006
“Rohu”	oral	0-500 mg kg <sup>-1</sup> ração	56 dias	14º, 28º, 42º e 56º dias	sem efeito	125 mg kg <sup>-1</sup> ração	proteína, albumina, globulina, lisozima, produção e atividade leucocitária	produção de ânion superóxido	MISRA; DAS; MUKHERJEE, 2009

No presente estudo, não foram detectados efeitos tóxicos do levamisol dietético para o cachara em doses de até 500 mg kg<sup>-1</sup>. Embora o desempenho e a eficiência alimentar com a inclusão de até 100 mg de levamisol kg<sup>-1</sup> de ração tenham apresentado uma melhora em números absolutos, a partir desta concentração houve piora, novamente em números absolutos, nos resultados de desempenho. Esta constatação pode ser prenúncio de efeitos adversos da suplementação dietética do levamisol para o cachara acima do nível de 100 mg kg<sup>-1</sup>. No entanto, tendo em vista que o período de carência do levamisol em surubins é curto (12 horas), a inclusão deste fármaco na dieta do cachara é, pois, prática segura. Entretanto, em vista dos resultados inconclusivos, estudo mais abrangente para definição das doses ideais para estimulação do crescimento é necessário.

### 3.3.2 Variáveis imunológicas

#### Proteína, albumina e globulina

As variáveis proteínas totais, albumina e globulina sérica do cachara não foram afetadas pela inclusão do levamisol na dieta. Normalmente, os valores de albumina e imunoglobulinas no soro aumentam com o uso de imunoestimulantes (CHOUDHURY et al., 2005), bem como a atividade bactericida do soro (SIWICKI; ANDERSON; RAMSEY, 1994). Entretanto, existem vários relatos na literatura em que o levamisol e outros imunoestimulantes não tiveram efeito na proteína total sérica, albumina ou globulina. Por exemplo, pacus alimentados por 30 dias com dietas contendo níveis de levamisol de 0-800 mg kg<sup>-1</sup> e mais 15 dias com dieta controle não apresentaram aumento da proteína plasmática (SADO; BICUDO; CYRINO, 2010). Também não foi registrado efeito do levamisol sobre aos níveis de proteínas e imunoglobulinas da carpa indiana alimentados a cada três dias por 16 dias com dieta contendo levamisol na dose de 5,0 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo (WIJENDRA; PATHIRATNE, 2007).

Contudo, existem dados que comprovam a atividade do levamisol e outros imunoestimulantes sobre proteínas séricas. Em carpas, proteína total e globulinas foram aumentadas após alimentação com levamisol na dose de 250 mg kg<sup>-1</sup> de ração aos 57 e 70 dias (MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2005). Esta mesma dose para carpa indiana aumentou proteínas totais e albumina sérica a partir do décimo quarto dia, e globulinas séricas a partir do vigésimo oitavo dia (MISRA; DAS; MUKHERJEE, 2009). Juvenis de catla *Catla catla* expostos a banhos com levamisol nas concentrações de 1,25 e 2,5 mg L<sup>-1</sup> tiveram os níveis de

proteína sérica total aumentados, principalmente aos 42 dias pós tratamento. No entanto, imunoglobulinas não foram afetadas (PERERA; PATHIRATNE, 2008).

Levando-se em consideração que índices de globulina, proteína e albumina sérica podem ser indicadores de saúde animal, podemos inferir que o levamisol não afetou negativamente a saúde do cachara, pois não se observou efeito sobre estas variáveis no modelo experimental utilizado (concentração, período e forma de administração: ininterrupto de 60 dias). A dose, a forma e o período ótimo de administração do levamisol para peixes ainda é bastante discutível, sendo que alguns trabalhos mostram que a resposta esperada é encontrada em períodos mais curtos (Tabela 10).

#### Lisozima sérica

A determinação da concentração da lisozima a partir da atividade da lisozima sérica foi feita a partir da curva de calibração obtida com um padrão de lisozima (Figura 7).

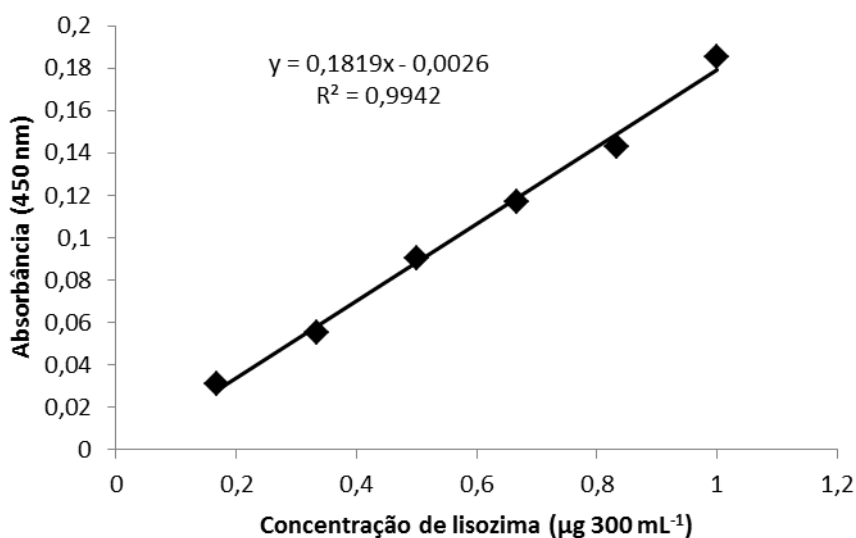


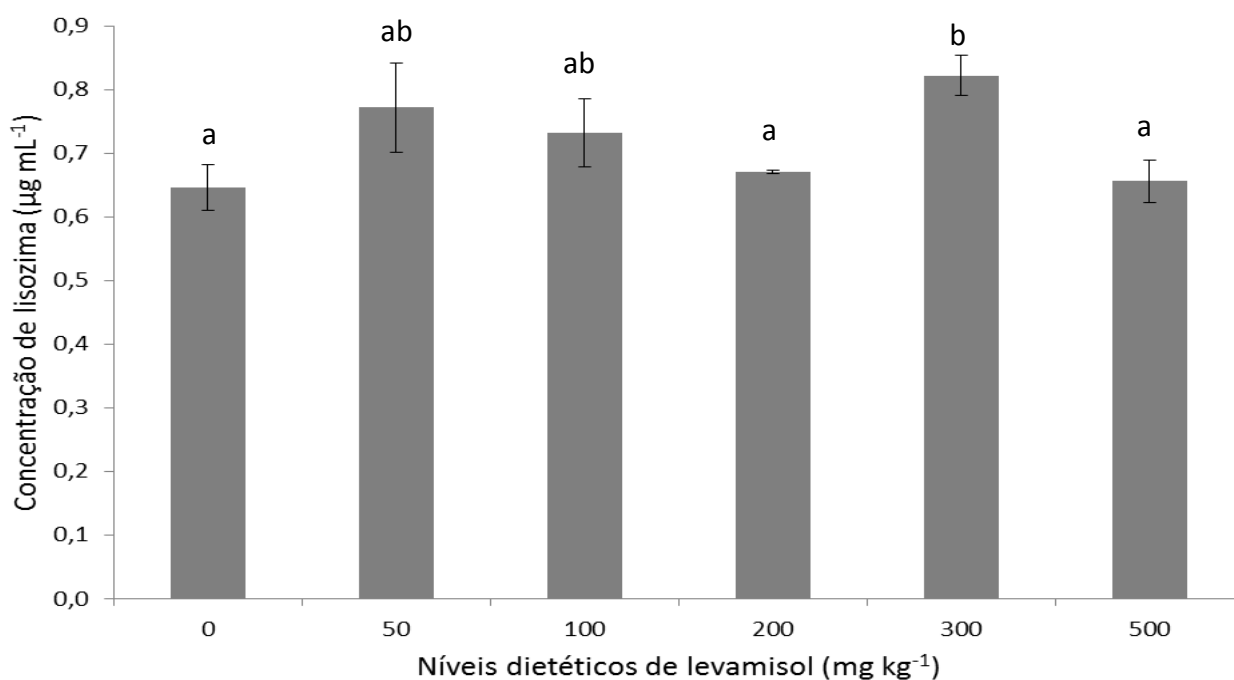
Figura 7 – Curva de calibração da lisozima

Foi registrado efeito do levamisol na atividade e concentração de lisozima sérica (Tabela 9). Uma curva/equação quadrática é aquela que melhor representa a tendência dos dados. Consequentemente, os melhores valores estimados foram de 213 ( $\text{U mL}^{-1}$ ) e 0,806 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para atividade (LA) e concentração de lisozima (LC), respectivamente. Para ambos, o ponto equivalente ao nível ótimo de inclusão de levamisol (lev) foi de 247  $\text{mg kg}^{-1}$  de ração – eq. (1) e (2).

$$LC = 0,6652 + 0,001139lev - 0,00000231lev^2 \quad (1)$$

$$LA = 175,53 + 0,3062lev - 0,00062lev^2 \quad (2)$$

O efeito do levamisol sobre a concentração de lisozima sérica é observado até a concentração de 300 mg kg<sup>-1</sup>. A partir desta concentração a resposta imunológica diminui, indicando que na dose de 500 mg kg<sup>-1</sup> de ração o levamisol já não é mais benéfico para o cachara (Figura 8).



1989).

Embora existam relatos em que o levamisol dietético não tenha afetado a atividade e a concentração de lisozima sérica em peixes, a maioria dos resultados encontrados é semelhante aos obtidos nesta pesquisa, inclusive a dose ótima sendo muito próxima à determinada para o cachara (Tabela 10). Por exemplo, este feito foi destacado em bagre africano alimentados por sete dias com dieta contendo levamisol nas doses de 150-300 mg kg<sup>-1</sup> (LI et al., 2006) e em carpa alimentadas com dieta contendo levamisol na dose de 250 mg kg<sup>-1</sup> ração, por 57 dias (MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009) e 30 dias (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006).

#### Atividade respiratória de leucócitos

Não foram registrados efeitos da suplementação dietética com levamisol sobre a atividade respiratória dos leucócitos para o cachara (Tabela 9). Concordando com os

resultados aqui registrados, vários estudos mostram a não atividade do levamisol sobre esta variável, como para “sunshine bass” sob o tratamento com levamisol dietético nas doses de 100-1000 mg kg<sup>-1</sup>, por 3 semanas (LI et al., 2006) e para carpa indiana alimentados com dieta contendo levamisol na dose de 5 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo, durante 16 dias (WIJENDRA; PATHIRATNE, 2007).

#### Resposta proliferativa celular leucocitária

Não foi registrado efeito do levamisol dietético sobre a proliferação de leucócitos isolados do sangue do cachara sob a ação do lipopolissacarídeo de *E. coli* [LPS], um estimulante da proliferação de linfócitos B (BOWNIK, 2006) (Tabela 9). Alguns experimentos *in vitro* já foram feitos testando a capacidade do levamisol em estimular a proliferação de leucócito, em combinação com o LPS. Por exemplo, após alimentar *Clarias fuscus* por sete dias com dieta contendo levamisol nas concentrações de 0-600 mg levamisol kg<sup>-1</sup> de ração, também não houve efeito sobre a proliferação de leucócitos pelo teste colorimétrico com MTT nos tempos de 2, 4 e 8 semanas (LI et al., 2006).

### 3.4 Considerações finais

Não existe dúvida acerca dos benefícios que a imunoestimulação proporciona na criação de animais, seja aumentando a produtividade ou mesmo evitando o uso de antibióticos. No entanto, apesar da importância do assunto, o efeito, a dosagem, a eficácia de acordo com idade e tamanho do peixe, bem como o tempo e a via de administração continuam sendo uma incógnita. Alguns compostos apresentam efeito quando usados intermitentemente por longos períodos; outros parecem que precisam ser administrados aos animais em períodos mais curtos ou mesmo em administrações intercaladas.

Diversos estudos demonstram os efeitos positivos do uso do levamisol como imunoestimulante, mas também um número expressivo de trabalhos prova o contrário. Por isso, é um fármaco promissor, mas que deve ser mais bem entendido e estudado. O levamisol teve efeito positivo sobre o sistema imunológico inespecífico no cachara, sendo a melhor dose do levamisol de 247 mg kg<sup>-1</sup> de ração. Esta dose foi a mais eficiente também para outras espécies, mostrando que nossos resultados estão de acordo com o que vem sendo encontrado para o fármaco.



Tratando-se de estudos com peixes, existe uma preocupação relacionada às variações entre os valores normalmente encontrados para cada variável. Muitas vezes é percebido um comportamento dos dados que pode ser entendido como benéfico do ponto de vista imunológico ou econômico. Neste trabalho a média do ganho de peso foi 10 % maior para o tratamento com 100 mg kg<sup>-1</sup> de ração. Outro exemplo é o dado de globulina sérica que melhora também no tratamento 100 mg kg<sup>-1</sup>. No entanto, em ambos os casos, diferenças estatísticas que atestam essa melhora não foram encontradas, pois os dados apresentaram grandes variações entre as unidades experimentais, impossibilitando, assim, a detecção de diferenças entre os tratamentos. Uma solução a este problema seria melhorar o poder da análise e, conseqüentemente, a confiabilidade dos dados aumentando o número de repetições e o número de animais amostrados.

O levamisol é um potencial candidato a imunoestimulante para ser empregado na aquicultura. É um produto rapidamente metabolizado e eliminado dos animais, apresentando segurança aos consumidores. Em estudo farmacocinético com pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) já foi demonstrado que o levamisol é eliminado do sangue em 12 horas a 27 °C (ZANON et al., 2012). Por isso, podemos dizer que este fármaco pode ser uma alternativa para a prevenção de doenças em piscicultura. No entanto, o uso levamisol como imunoestimulador ou promotor de crescimento em animais, principalmente em produção de organismos aquáticos, passa pela elucidação de várias e persistentes indagações.

## Referências

- ABREU, J. S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com  $\alpha$ -1,3-glicano**: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura. 2007. 123p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Jaboticabal, SP, 2007.
- ANDERSON D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, Amsterdam, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ANDERSON, D.P.; JENEY, G. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmoniida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 34, p. 379-389, 1992.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). **Diseases in Asian Aquaculture II**. Metro Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 1995.p. 185-202
- BOWNIK A. In vitro effects of staphylococcal leukocidin Luke/LukD on the proliferative ability of lymphocytes isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 656-659, 2006.
- BUITRAGO-SUÁREZ, U.A.; BURR, B.M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, Auckland, v.1512, p. 1–3, 2007.
- CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Spix & Agassiz, 1829) e outras espécies do gênero e seus híbridos. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2 ed. Santa Maria:Editora da UFSM, 2010. p. 335-382.
- CABAJ, W.; STANKIEWICZ, M.; JONAS, W.E.; MOORE, L.G. Levamisole and its influence on the immune responses of lambs. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 19, p. 17–26, 1995.
- CHOUDHURY, D.; PAL, A.K.; SAHU, N.P.; KUMAR, S.; DAS, S.S.; MUKHERJEE, S.C. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in carpa indiana (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 3, p. 281-291, 2005.
- CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by Vitamin C. **Fish Shellfish Immunology**, Oxford, v. 13, p. 97-109, 2002.
- ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C; ANDERSON, D.P.; ROBERTSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B. **Techniques in Fish Immunology**. Fair Heaven: SOS Publications, 1990. p. 101-103.

- FINDLAY, V.L.; MUNDAY, B.L. The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of fish Diseases**, Oxford, v.23, p. 369–378, 2000.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. The State of World Fisheries and **Aquaculture**. Fisheries Department, Rome, Italy. 2010. 218p.
- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 179-187, 2006.
- HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. Fish health aspects in grouper aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 320, p. 1-21, 2011.
- ISPIR, Ü.; YONAR, M.E. Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). **Acta Veterinaria BRNO**, Brno, v. 76, p. 493-497, 2007.
- KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**, Hokkaido, v. 25, p. 93-98, 1990.
- KLEIN, J. **Immunology**. Cambridge: Blackwell Scientific, 1990. 508p.
- KUSUDA, R.; KAWAI, K. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. **Fish Pathology**, Oxford, v. 33, p. 221-227, 1998.
- LEAÑO, E.M.; GUO, J.; CHANG, S.; LIAO, C. Levamisole enhances non-specific immune response of Cobia, *Rachycentron canadum*, fingerlings. **Journal of the Fisheries Society of Taiwan**, Keelung, v. 30, p. 321-330, 2004.
- LEWIS, J.A.; WU, C.H.; BERG, H.; H. LEVINE, J.H. the genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, Bethesda, v. 95, p. 905-928, 1980.
- LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D.M. 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**, Oxford, v. 35, p. 1380-1383, 2004.
- \_\_\_\_\_ Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 251, p. 201-209, 2006.
- LI, G.; GUO, Y.; ZHAO, D.; QIAN, P.; SUN, J.; XIAO, C.; LIANG, L.; WANG, H. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, p. 212-217, 2006.
- LUNDÉN, T.; MIETTINEN, S.; LÖNNSTRÖM, L.G.; LILIUS, E.M.; BYLUND, G. Influence of oxitetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 217-230, 1998.

- MAQSOOD, S.; SAMOON, M.H.; SINGH, P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 9, p. 111-120, 2009.
- MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. Immune response, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings fed with levamisole supplemented diets for longer duration. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 356-365, 2009.
- MORRISON, R.N.; NOWAK, B.F.; CARSON, J. The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 195, p. 23-33, 2001.
- MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MUÑOZ, J.; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 49-62, 1998.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: FAO, 2008. 276p.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de Peixes – Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1999. 311p.
- PERERA, H.A.C.C.; PATHIRATNE, A. Enhancement of immune responses in Indian carp, *Catla catla*, following administration of levamisole by immersion. In: BONDAD-REANTASO, M.G.; MOHAN, C.V.; CRUMLISH, M.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). **Diseases in Asian Aquaculture VI**. Fish Health Section. Manila: Asian Fisheries Society; 2008. p.129-142.
- RIJKERS, G.T.; TEUNISSEN, A.G.; VAN OOSTEROM R.; VAN MUISWINKEL, W.B.; The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 19, p. 177-189, 1980.
- SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 41, p. 66-75, 2010.
- SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of health and aflatoxin-induced immunocompromised carpa indiana, *Labeo rohita*. **Journal of Applied Aquaculture**, Philadelphia, v. 11, p. 15-25, 2001.
- \_\_\_\_\_. The effect of dietary immunomodulation upon Edwardsiella tarda vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 12, p. 1-16, 2002.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, p. 63-92, 1999.
- SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. **Methods for fish biology**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. 684p.

SIWICKI, A.K. Immunomodulating activity of levamisole in spawners carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Fish Biology**, London, v. 31, p. 245-246, 1987.

\_\_\_\_\_. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental Comparative Immunology**, Oxford, v.13, p. 87-91, 1989.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 41, p. 125–139, 1994.

SIWICKI, A.K.; COSSARINI-DUNIER, M. Effect of levamisole on the lymphocyte and macrophage activity in carp *Cyprinus carpio*. **Annales Recherche Vétérinaire**, London, v. 21, p. 95-100, 1990.

SODERBERG, R.W. **Flowing Water Fish Culture**. Boca Raton: CRC Press; Lewis Publishers, 1995. 147p.

WIJENDRA, G.D.N.P.; PATHIRATNE, A. Evaluation of immune responses in an indian carp, *Labeo rohita* (hamilton) fed with levamisole incorporated diet. **Journal of Science - University of Kelaniya**, Kelaniya, v. 3, p. 17-28, 2007.

ZANON, R.B.; CEROZI, B.S.; SILVA, T.S.C.; CYRINO, J.E.P. Pharmacokinetic of levamisole in speckled surubim *Pseudoplatystoma corruscans*. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford. Early view available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvp.12002/pdf>.

## 4 VITAMINA E COMO IMUNOESTIMULANTE PARA CACHARA *PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM*

### Resumo

A intensificação da piscicultura aumenta as chances de ocorrência de epizootias dentro dos sistemas de produção devido ao maior estresse imposto aos animais (lotação, manejo, transporte etc). O presente projeto teve como objetivo determinar a eficácia da utilização da vitamina E como imunomodulador na dieta de juvenis de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*. Juvenis de cachara ( $38,1 \pm 4,94$  g e  $17,5 \pm 1,5$  cm) foram alojados em caixas de polietileno (300 L; 3 repetições contendo 10 peixes cada) em um delineamento inteiramente casualizado, e alimentados com uma dieta semi-purificada suplementada com 0,0; 25; 50; 100; 200 e 300 mg DL- $\alpha$ -tocoferol  $\text{kg}^{-1}$  de ração. A resposta imunológica foi melhorada com a dose dietética de 166 mg acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol de  $\text{kg}^{-1}$  pois houve aumento do conteúdo de globulinas séricas. No entanto, não foram registrados efeitos dos tratamentos sobre as variáveis de desempenho.

Palavras-chave: Cachara; Imunoestimulante; Vitamina E; Aquicultura

### Abstract

The intensification of fish farming systems increases occurrence diseases within the production systems as a result of increased stress of farmed fish imposed by farming practices, e.g. stocking, handling, transportation, etc. This study evaluates effects of dietary vitamin E on immunological modulation of striped surubim, *Pseudoplatystoma fasciatum*. Trial was set up in a completely randomized design with six treatments – i.e. diets containing 0.0; 25; 50; 100; 200 e 300 mg DL- $\alpha$ -tocoferol acetate per kg of feed ( $n=3$ ) – fed to juvenile striped surubim ( $38.1 \pm 4.94$  g e  $17.5 \pm 1.5$  cm) randomly stocked in 18 plastic tanks (300 L; 10 fish per tank, in triplicate) and fed until apparent satiation, twice a day, for 90 days. No differences in growth parameters were recorded. Dietary vitamin E did not affect serum protein and albumin, as well as leukocyte respiratory burst activity; lisozime activity and leukocyte proliferation. However, vitamin E levels positively influenced the immune system increasing serum globulins at dose of  $166 \text{ mg kg}^{-1}$  of DL- $\alpha$ -tocopherol acetate.

Keywords: Immunomodulation; Vitamin E; Striped surubim; Aquaculture

### 4.1 Introdução

O constante crescimento da atividade aquícola condiciona a intensificação dos sistemas de produção de peixes, a produção de surubins aí incluída. À medida que a produção de uma espécie é intensificada, diversos fatores estressantes como transporte, desinfecção, reprodução artificial e adensamento populacional passam a afetar a homeostasia dos animais,

ocasionando uma maior sensibilidade e, como consequência, menor resistência às enfermidades (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006; KUSUDA; KAWAI, 1998; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1999; SADO; BICUDO; CYRINO et al., 2010; SAKAI, 1999).

Para evitar essas epizootias, a prevenção das doenças parece ser mais vantajosa do que o tratamento medicamentoso (MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009), principalmente pelo fato de que o uso constante e indevido de medicamentos específicos, como antibióticos, pode não só vir a gerar cepas resistentes e mais patogênicas (LEWIS et al., 1980), como também imunossuprimir os animais e submeter os próprios animais e o ambiente ao efeito cumulativo da substância, gerando impacto ambiental (ANDERSON, 1992; RIJKERS et al., 1980; LUNDÉN et al., 1998; MAQSOOD; SAMOON; SINGH, 2009). A vacinação tende a ser o método mais eficaz para controle das enfermidades, mas ainda é uma ciência em desenvolvimento na piscicultura (SAKAI, 1999; HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011). Nesse contexto e, de modo ideal, trabalha-se com profilaxia. Evita-se o uso de tratamento medicamentoso mantendo um ambiente saudável, ou dando aos animais a capacidade de combater os agentes patogênicos *per se*, mesmo em condições de ambientes degradados, através do estímulo de suas funções imunológicas.

Pesquisas mostrando interações entre dieta e imunidade na busca pela manutenção ou melhora da saúde dos peixes têm recebido atenção e investimentos na área de nutrição de peixes, principalmente em relação ao uso de probióticos, prebióticos e outros imunoestimulantes (LI et al., 2006). Os imunoestimulantes são substâncias utilizadas para modular o sistema imunológico dos animais, aliados a estudos hematológicos e bioquímicos comumente utilizados como diretrizes ou indicadores do estado funcional (SCHRECK; MOYLE, 1990). Informações ainda são necessárias sobre a imunização em peixes, bem como para o avanço do conhecimento do sistema imunológico e suas funções.

A vitamina E é um nutriente que apresenta função no sistema imunológico, estimulando mecanismos de defesa humorais e celulares (PANUSH; DELAFUENTE, 1985), como o aumento na atividade fagocítica e produção de leucócitos (BELO et al., 2005; MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998; PENG; GATLIN III, 2009; PULSFORD et al., 1995; ORTUÑO et al., 2001; WISE et al., 1993). Vitamina E é uma descrição genérica para todas as moléculas que possuem a atividade biológica do  $\alpha$ -tocoferol; juntamente com o selênio, age com a enzima glutathiona peroxidase como parte de um sistema antioxidante multicomponente. Este sistema protege o organismo dos efeitos adversos dos radicais livres e, assim, previne a peroxidação lipídica e a oxidação de macromoléculas celulares (DNA, proteínas, lipídeos) (NRC, 2011; CHEN et al., 2004). Até mesmo a qualidade da carne é

afetada pela concentração de vitamina E, pois a oxidação dos ácidos graxos no filé é um dos fenômenos que determina o “off flavor” em peixes (HALVER, 2002).

Raquitismo, alteração na pigmentação da pele, hemorragia nas nadadeiras, degeneração muscular, anemia, fragilidade dos eritrócitos, apatia, redução de crescimento, mortandade, deposição de lipídeos e ceroides no fígado e baço, baixo índice hepatossomático, edema cardíaco, baixo hematócrito, ascite e lordose são todos sinais relacionados à deficiência de vitamina E em peixes (HAMRE et al., 1997; NRC, 2011; PENG; GATLIN III, 2009; ROEM; KOHLER; STICKNEY, 1990). Assim sendo, a concentração de vitamina E na dieta determina, muitas vezes, o sucesso na criação animal em piscicultura (SATO; TAKEUCHI; WATANABE, 1987; WILSON; BOWSER; POE, 1984; SAU et al., 2004; PENG; GATLIN III, 2009).

O objetivo deste trabalho foi estudar o uso da vitamina E como do imunodulador dietético para o cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*, siluriforme nativo das bacias do São Francisco e Paraná que pode alcançar na natureza até 20 kg de peso vivo. As excelentes características organolépticas de sua carne, assim como a ausência de espinhos intramusculares, fazem deste peixe um dos mais apreciados no Brasil e também, uma das espécies neotropicais mais promissoras para piscicultura interior (BUITRAGO-SUAREZ; BURR, 2007; CAMPOS, 2007). As informações geradas neste trabalho são de aplicação imediata à produção comercial da espécie.

## 4.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados em um sistema de recirculação de água, com controle do fotoperíodo (12/12 horas) e temperatura e aeração mecânica da água. Diariamente foram monitorados a temperatura ( $27,5 \pm 0,96$  °C), o pH ( $7,65 \pm 0,06$ ), o oxigênio dissolvido ( $6,1 \pm 0,4$  mg L<sup>-1</sup>), os sólidos totais dissolvidos ( $1,64 \pm 0,05$  g L<sup>-1</sup>), a condutividade elétrica da água ( $2,56 \pm 0,08$  mS cm<sup>-1</sup>) e a salinidade ( $0,13 \pm 0,006$  %) (sonda Horiba U-52). Semanalmente foi mensurada a amônia total (< 0,25 ppm) e os tanques foram sifonados para remoção de matéria orgânica. Em todas as etapas de manejo e coleta de dados os peixes foram anestesiados (Eugenol, 1:50.000 v/v).



#### 4.2.1 Aceitabilidade da dieta semi-purificada à base de farinha de peixe desengordurada

A farinha de peixe é um importante ingrediente em dietas para peixes ictiófagos. No entanto, este ingrediente não deve ser utilizado em estudos que buscam determinar as exigências em vitaminas em função do seu teor em vitaminas, especialmente as lipossolúveis. Por outro lado, o uso exclusivo de ingredientes purificados torna a ração pouco aceitável aos animais (SHIAU; LAN, 1996). Assim, avaliou-se a farinha de peixe desengordurada como um substituto da farinha de peixe, uma vez que nesta forma os componentes lipofílicos são retirados, dentre eles a vitamina E.

A farinha de peixe desengordurada foi obtida pela extração a quente da fração lipídica com solvente orgânico (hexano:etanol, 4:1, v/v), em três passagens com 2,5 L de solvente para cada 500 g de farinha de peixe comercial (PENG; GATLIN III, 2009). A análise química-bromatológica da farinha de peixe desengordurada está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 - Composição química das farinhas de peixe original e desengordurada

Composição	Original	Desengordurada
	----- % -----	
Proteína bruta	63,38	63,09
Extrato etéreo	9,59	1,52
Matéria mineral	28,4	29,10
Fibra bruta	1,97	2,01
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	4405	3568

Comparou-se a aceitabilidade de uma dieta contendo farinha de peixe desengordurada com a dieta semi-purificada e comercial para juvenis de cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*. Para tanto, dietas isoenergéticas e isoproteicas (energia bruta 3950 kcal kg<sup>-1</sup>; proteína bruta 45 %) foram formuladas e processadas por peletização (3,0 mm) (Tabela 12). Juvenis de cachara (27,0 ± 3,5 g) foram distribuídos em nove caixas plásticas (300 L, n=6), em um delineamento inteiramente casualizado (n=3), e alimentados por sete dias em uma refeição diária (19h00m) em volume constante: 25 grânulos por caixa. Após 10 minutos da alimentação, o número de grânulos não consumidos foi contado em cada unidade experimental.

Tabela 12 - Composição das dietas experimentais para teste de aceitabilidade de farinha de peixe desengordurada

Ração comercial		Farinha de peixe (FP) desengordurada		Dieta semi-purificada	
Ingrediente	%	Ingrediente	%	Ingrediente	%
Farinha de Peixe	58,00	FP desengordurada	30,00	Caseína	41,00
Farelo de soja	4,00	Gelatina	18,50	Gelatina	10,00
Glúten de milho	8,00	Caseína	13,00	Dextrina	28,00
Quirera de arroz	18,00	Dextrina	26,48	Óleo de milho	9,50
Óleo de peixe	8,00	Óleo de milho <sup>1</sup>	8,00	Carbonato de cálcio	0,80
DL-Metionina	0,50	Sal	0,50	Fosfato bicálcico	3,00
Premix	1,00	DL-Metionina	0,50	DL-Metionina	0,50
Celulose	2,48	Premix <sup>2</sup>	1,00	Premix <sup>2</sup>	1,00
BHT	0,02	Celulose	2,00	Celulose	5,98
		BHT	0,02	BHT	0,02

<sup>1</sup> Óleo de milho isento de vitamina E (US Biochemical Corp., Cleveland, OH, USA).

<sup>2</sup> Premix vitamínico e mineral isento em vitamina E (Vitagri® Apucarana-PR). Composição: cada kg contem: vit. A (990 UI g<sup>-1</sup>), vit. D3 (189 UI g<sup>-1</sup>), vit. K3 (225 mg kg<sup>-1</sup>), vit B1 (202,5 mg kg<sup>-1</sup>), vit. B2 (720 mg kg<sup>-1</sup>), vit. B6 (450 mg kg<sup>-1</sup>), vit. B12 (1620 µg kg<sup>-1</sup>), Biotina (16200 µg kg<sup>-1</sup>), Ac. Ascórbico (192,5 mg kg<sup>-1</sup>), Ac. Pantotênico (1620 mg kg<sup>-1</sup>), Ác. Fólico (45000 µg kg<sup>-1</sup>), Ác. Nicotínico (3150 mg kg<sup>-1</sup>), Colina (52500 mg kg<sup>-1</sup>), Mn (5400 mg kg<sup>-1</sup>), Cu (630 mg kg<sup>-1</sup>), Fe (4050 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (4500mg kg<sup>-1</sup>), I (54 mg kg<sup>-1</sup>), Se (22,5mg kg<sup>-1</sup>).

#### 4.2.2 Vitamina E dietética como imunomoduladora

Para o estudo imunoestimulatório da vitamina E, os peixes foram submetidos a um período de 45 dias recebendo a dieta controle para diminuir as reservas desta vitamina no organismo. Fez-se o doseamento do  $\alpha$ -tocoferol na dieta controle por HPLC (BAKER; DAVIES, 1996) constatando-se que esta vitamina estava presente na concentração de 3,40 mg kg<sup>-1</sup> de ração. Após este período preparatório, 180 juvenis de cachara (38,1 ± 4,94 g; L<sub>S</sub> = 17,5 ± 1,5 cm) provenientes de piscicultura comercial (Campo Grande, MS, Brasil) foram alojados em caixas de polietileno (300,0 L; n=10 peixes) em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (n=3), e alimentados com dietas experimentais contendo doses crescentes de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol (ROVIMIX® E-50 Adsorbate; DSM, Shanghai, China) incluídas na dieta basal semi-purificada, formulada à base de farinha de peixe desengordurada (Tabela 12). A inclusão de níveis de vitamina E de 0; 25; 50; 100; 150 e 300 mg kg<sup>-1</sup> de ração resultaram em rações contendo as seguintes concentrações esperadas de vitamina E: 3,4; 28,4; 53,4; 103,4; 153,4 e 303,4 mg kg<sup>-1</sup>. Após a mistura dos ingredientes, as dietas foram peletizadas, secas em estufa de ar circulante por 48 horas e mantidas refrigeradas durante todo período experimental.

Ao final do período experimental, os peixes foram submetidos a jejum de 24 horas, anestesiados, pesados e medidos para cálculo dos seguintes dados de desempenho:

- *Ganho de peso*

$$GP = [(\text{peso final}) - (\text{peso inicial})]$$

- *Consumo de ração*

- *Conversão alimentar*

$$CA = [(\text{consumo de ração}) \div (\text{ganho de peso})]$$

- *Taxa de crescimento específico*

$$TCE = \{100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \div \text{período}]\}$$

- *Índice hepatossomático*

$$IHS = (\text{peso do fígado/peso do peixe}) \times 100$$

Foi realizado, também, estudo histológico do fígado dos animais. Após a pesagem dos fígados coletados de três peixes por repetição (nove amostras por tratamento), uma excisão de tecido hepático foi fixada em solução de Bouin, por seis horas, e na sequência foi lavada em água corrente e armazenada em álcool 70 °GL até ser processada. Para execução dos cortes, as amostras foram incluídas em parafina e cortadas à espessura de 5 µm, seguido de coloração com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram analisados sob microscópio óptico em busca de anormalidades e/ou patologias no tecido hepático.

#### 4.2.3 Quantificação da vitamina E no fígado e músculo dos peixes

A concentração vitamina E no músculo e no tecido hepático está correlacionada à saúde do animal, sendo que a determinação do melhor nível de inclusão de vitamina E na dieta depende, também, do conhecimento deste parâmetro. Desta forma, foi determinada a concentração de vitamina E no fígado e filé dos cacharas. Os animais restantes do experimento foram sacrificados (benzocaína, 1,0 g L<sup>-1</sup>), os tecidos muscular e hepático foram coletados, homogeneizados, sub-amostrados e as amostras mantidas refrigeradas (-80 °C) até quantificação do  $\alpha$ -tocoferol (HPLC, n=2) (BAKER; DAVIES, 1996).

#### 4.2.4 Respostas imunológicas

Usando-se seringas e agulhas descartáveis, sem anticoagulante, foram obtidas por punção do vaso caudal amostras de sangue de três animais por repetição. As amostras foram imediatamente separadas em dois tubos tipo “Eppendorf”, um contendo anticoagulante (heparina, 10  $\mu\text{L}$ ), para utilização de sangue total para a análise de atividade respiratória dos leucócitos, e outro sem anticoagulante, para obtenção do soro (2 horas a temperatura ambiente e abrigo da luz) para as análises de proteína total, albumina e globulina, bem como da atividade e concentração da lisozima sérica. O soro foi obtido por centrifugação (2100 g, 5 minutos).

##### Concentração de proteínas totais, albumina e globulinas séricas

A proteína total e a albumina sérica foram quantificadas por kits de ensaios colorimétricos (Bioclin®, Belo Horizontem MG). A concentração total de globulinas no soro foi obtida pelo método indireto com a diferença entre a concentração de proteína total e albumina.

##### Concentração de lisozima

A concentração de lisozima foi realizada utilizando o soro dos peixes por meio de ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Abreu (2007). As amostras de soro foram submetidas a tratamento térmico (56 °C por 30 minutos) para desnaturação e inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* fosse provocada exclusivamente por ação da lisozima.

Em cubeta de 1,0 mL foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de soro e 150  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH 6,2). Após dois minutos de incubação a 26 °C, foram adicionados a cada cubeta 300  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg mL<sup>-1</sup>). A redução da densidade óptica ( $\Delta_{\text{DO}}$ ; 450 nm) foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 26 °C (espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan, com controlador de temperatura) e os resultados da atividade de lisozima foram expressos em unidade U mL<sup>-1</sup> de soro. A concentração de lisozima nas amostras foi determinada com o uso da equação obtida na curva de calibração usando concentrações de lisozima padrão (L 6876; Sigma, Saint Louis, MO, USA).

#### Atividade respiratória de leucócitos

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada de acordo com Anderson e Siwicki (1995): determinação das espécies reativas de oxigênio produzidos no *burst* oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma um precipitado com coloração azul escuro no interior dos fagócitos, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990). Uma mistura de 0,1 mL do sangue total e 0,1 mL de NBT 0,2 % (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi incubada por 30 minutos a 25 °C; 50 µL da suspensão homogeneizada foram dissolvidos em 1,0 mL de N, N-dimetil formamida (DMF; Sigma, St. Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 minutos para lise da parede celular dos leucócitos, solubilização dos grânulos de *formazan* e liberação do NBT reduzido. Na sequência, foi determinada a absorbância da solução em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan).

#### Resposta proliferativa celular leucocitária

O ensaio de cultura leucocitária seguiu metodologia descrita por Bownik (2006) e Sakai et al. (1996). Dois peixes de cada repetição foram exsanguinados por punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas heparinizadas; todas as etapas de isolamento e proliferação celular foram conduzidas com material e ambiente totalmente assépticos. O sangue obtido (1,0 mL) foi ressuscitado em 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma; St. Louis, MO, USA). Os leucócitos foram isolados por centrifugação: 6 mL do sangue diluído foi depositado cuidadosamente sobre 3 mL de solução gradiente ficoll histopaque (Sigma; St. Louis, MO, USA) e centrifugado, 1930 g por 30 minutos a 22 °C. A nuvem de leucócitos foi coletada com pipeta Pasteur e lavada três vezes com meio de cultura (centrifugação, descarte de sobrenadante e ressuspensão). A viabilidade das células foi avaliada com o reagente *trypan blue* 0,4 % (Sigma; Saint Louis, MO, USA). As células foram suspensas em meio de cultura a uma concentração de  $2,5 \times 10^6$  células viáveis por mL. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 contendo 10 % de soro fetal bovino (Sigma - Saint Louis, MO, USA), 2 mM de L-glutamina, 1 % de tampão HEPES e 1 % de solução estreptomicina e penicilina (Sigma; Saint Louis, MO, USA). Utilizou-se como estimulador de multiplicação celular a concanavalina-A na concentração de  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para estimulação de linfócitos T e lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) na concentração de  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a estimulação de linfócitos B (Sigma; St Louis, MO, USA); cada amostra foi testada em triplicata.

As amostras foram incubadas em placas de 96 poços (Corning Costar Co.; Cambridge, MA, USA). Em cada poço foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de suspensão de células, a respectiva solução de estimulante (5  $\mu\text{L}$  de uma solução 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  de concanavalina-A; 2,5  $\mu\text{L}$  de uma solução de 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  de LPS) e a quantidade necessária de meio de cultura para completar 200  $\mu\text{L}$  por poço. As células foram deixadas em cultura por 72 horas a 25 °C. A proliferação celular e a sobrevivência das células foi analisada por ensaio colorimétrico utilizando-se o reagente 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma; St. Louis, MO, USA). Para tanto, 50  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (5 $\text{mg mL}^{-1}$ , em meio de cultura) foi adicionado em cada poço e a placa foi agitada por 5 minutos, incubada por 4 horas e centrifugada a 1900 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e sobre as células de cada poço foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (Sigma; St. Louis, MO, USA). A placa foi agitada por 15 minutos e lida em leitor de microplaca Elisa a 620 nm (HZ Thermo Scientific Elisa).

#### **4.2.5 Análises estatísticas**

A análise exploratória dos dados revelou heterogeneidade de variâncias. Desta forma, foi feito agrupamento das variâncias semelhantes e os dados foram submetidos à ANOVA ( $\alpha=0,05$ ). Em caso de existência de efeito significativo, realizou-se análise de regressão para determinação do nível ótimo de suplementação considerando-se as variáveis de desempenho e imunologia. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software SAS, versão 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### **4.3 Resultados e discussão**

#### **4.3.1 Aceitabilidade de dieta semi-purificada preparada a base de farinha de peixe desengordurada**

A composição da dieta afetou o consumo de ração. Foi registrado consumo de 100 % dos pélletes de dieta comercial fornecidos, em todos os sete dias de experimentação. A dieta teste, i.e., formulada com farinha de peixe desengordurada foi consumida moderadamente até o terceiro dia, com crescimento constante do quarto dia em diante até atingir 100 % no sétimo dia. No entanto, para a dieta semi-purificada, i.e., dieta formulada sem a farinha de peixe desengordurada, o consumo foi baixo durante todo o período experimental (Figura 9).

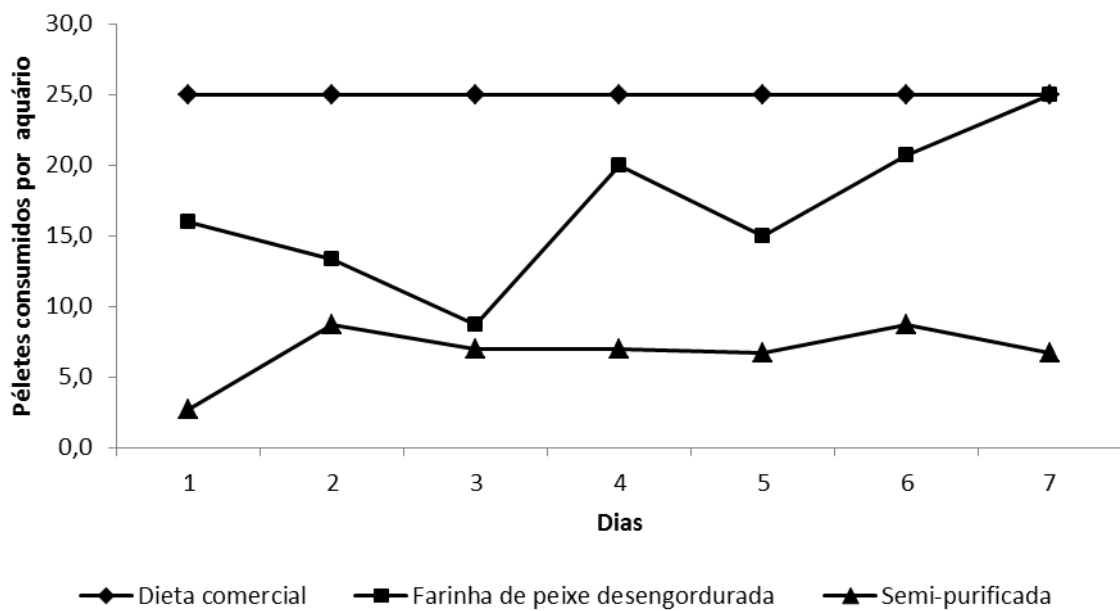


Figura 9 - Consumo das diferentes dietas pelo *Pseudoplatystoma fasciatum*

Dessa forma, a aceitabilidade da dieta teste pelo cachara foi considerada boa e, conseqüentemente, a farinha de peixe desengordurada considerada alternativa viável como fonte proteica em dietas semi-purificadas a serem empregadas em estudos com *Pseudoplatystoma* sp. e demais espécies ictiófagas. É recomendável, entretanto, observar um período de adaptação dos peixes de quatro dias para início de um período de alimentação com fins experimentais.

#### 4.3.2 Desempenho e análises histológicas

A suplementação da ração com níveis de vitamina E não afetou as variáveis de desempenho do cachara ( $p > 0,05$ ) (Tabela 13). De fato, pesquisas usando níveis dietéticos de vitamina E nem sempre têm efeito sobre o desempenho de peixes ou induzem aparecimento de sinais de deficiências, a exemplo do relatado para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (COWEY; ADRON; YOUNGSON, 1983), tilápia (NAVARRO et al., 2010), catfish (WILSON; BOWSER; POE, 1984), salmão “Coho” *Oncorhynchus kisutch* (HUANG et al., 2004) e “halibut” do Atlântico *Hippoglossus hippoglossus* (LEWIS-McCREA; LALL, 2007). No entanto, vários estudos já determinaram melhor nível de suplementação de vitamina E com base no desempenho, como para a tilápia do Nilo - 25 mg kg<sup>-1</sup> ração (SATOH; TAKEUCHI; WATANABE, 1987), para bagre do canal - 30 mg kg<sup>-1</sup> ração (WILSON;

BOWSER; POE, 1984), para carpa indiana - 131,91 mg kg<sup>-1</sup> ração (SAU et al., 2004), para “red drum” *Sciaenops ocellatus* - 31 mg kg<sup>-1</sup> ração (PENG; GATLIN III, 2009), para catla *Catla catla* - 150 mg kg<sup>-1</sup> ração (SINHA; SINHA, 1994), para “snakehead” *Channa punctatus* - 140 mg kg<sup>-1</sup> ração (NASSR-ALLAH; ABIDI; KHAN, 2012) e “red seabream” *Pagrus major* - 100 mg kg<sup>-1</sup> ração (GAO et al., 2012).

A não determinação de um efeito ótimo no desempenho do cachara pode ser resultado da ação de vários fatores, por exemplo, a interação da vitamina E com a astaxantina (CHRISTIANSEN et al., 1995), o selênio (BELL et al., 1985; POSTON; COMBS; LEIBOVITZ, 1976) e a vitamina C (HAMRE et al., 1997; LEE; DABROWSKI, 2003; LEE; DABROWSKI, 2004; YILDIRIM-AKSOY et al., 2008), suplementada na dieta dos cacharas neste estudo. Bagres do canal alimentados com dieta isenta em vitamina C apresentaram desempenho reduzido, mesmo quando havia suplementação extra de vitamina E na dieta, mas sinais de deficiência em vitamina E não foram observados em peixes alimentados com uma dieta isenta em vitamina E, mas suplementada com vitamina C (GATLIN III; POE; WILSON, 1986). Estudos com resultados similares, i.e., mostrando que a vitamina C poupa a vitamina E de forma dose-dependente, foram feitos com salmão do Atlântico (HAMRE et al., 1997), com esturjão (LEE; DABROWSKI, 2003) e com truta (FRISCHKNECHT; WAHLI; MEIER, 1994).



Tabela 13 - Efeito de vitamina E dietética nas variáveis de desempenho para o cachara (média ± DP).

Vitamina E	PI	PF	GP	TCE	CR (g peixe <sup>-1</sup> )	CA	IHS
mg kg <sup>-1</sup> ração	g			% dia <sup>-1</sup>	g		%
3,4	37,9 ± 0,35	72,3 ± 15,14	34,3 ± 16,56	0,74 ± 0,269	79,3 ± 7,043	2,56 ± 1,029	1,05 ± 0,302
28,4	38,6 ± 0,41	90,24 ± 7,75	51,7 ± 7,43	1,00 ± 0,091	94,9 ± 3,106	1,86 ± 0,228	1,09 ± 0,048
53,4	37,2 ± 1,66	77,96 ± 7,76	40,8 ± 6,47	0,87 ± 0,077	82,1 ± 6,406	2,04 ± 0,247	0,84 ± 0,068
103,4	38,0 ± 0,36	73,22 ± 1,46	35,2 ± 1,10	0,77 ± 0,013	79,4 ± 6,791	2,25 ± 0,125	1,16 ± 0,045
153,4	38,2 ± 0,60	67,5 ± 2,79	29,3 ± 3,06	0,67 ± 0,058	76,8 ± 5,184	2,63 ± 0,173	1,01 ± 0,124
303,4	38,3 ± 0,58	77,82 ± 9,05	39,5 ± 8,75	0,83 ± 0,133	76,0 ± 12,179	1,95 ± 0,253	0,98 ± 0,170

Legenda: PI - peso inicial; PF - peso final; GP - ganho de peso; TCE - taxa de crescimento específico; CR - consumo de ração; CA - conversão alimentar; IHS - índice hepatossomático.

Tabela 14 - Efeito da vitamina E dietética nas variáveis imunológicas para o cachara (média ± DP).

Vitamina E	LA	LC	Burst resp.	LPS	ConA	Proteína sérica	Alb. sérica	Glob. totais
mg kg <sup>-1</sup> ração	U mL <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>	Abs. 540 nm	Abs. 620 nm	Abs. 620 nm	g dL <sup>-1</sup>		
3,4	0,160 ± 0,0333	0,90 ± 0,183	0,543 ± 0,0153	0,154 ± 0,0035	0,143 ± 0,027	3,02 ± 0,625	0,96 ± 0,080	1,83 ± 0,545 <sup>b</sup>
28,4	0,183 ± 0,0338	1,02 ± 0,186	0,544 ± 0,0240	0,132 ± 0,0131	0,181 ± 0,043	3,02 ± 0,399	0,96 ± 0,171	2,06 ± 0,410 <sup>ab</sup>
53,4	0,158 ± 0,0281	0,88 ± 0,154	0,547 ± 0,0027	0,124 ± 0,0125	0,145 ± 0,035	2,98 ± 0,325	1,05 ± 0,043	1,93 ± 0,284 <sup>b</sup>
103,4	0,217 ± 0,0320	1,21 ± 0,176	0,518 ± 0,0206	0,137 ± 0,0236	0,143 ± 0,015	3,57 ± 0,335	1,09 ± 0,228	2,47 ± 0,107 <sup>a</sup>
153,4	0,169 ± 0,0489	0,94 ± 0,269	0,526 ± 0,0669	0,144 ± 0,0041	0,130 ± 0,020	3,76 ± 0,362	1,11 ± 0,149	2,66 ± 0,297 <sup>a</sup>
303,4	0,160 ± 0,0296	0,89 ± 0,163	0,568 ± 0,0115	0,157 ± 0,0192	0,146 ± 0,002	3,23 ± 0,066	0,98 ± 0,086	2,25 ± 0,098 <sup>ab</sup>

Legenda: LA - atividade de lisozima; LC - concentração de lisozima; LPS - cultura de células com estimulador LPS; ConA - cultura de células com estimulador Concanavalina-A; P - proteína sérica; Alb. sérica - albumina sérica; Glob. totais - globulinas séricas totais.

A exigência em vitamina E em peixes é afetada pela suplementação mineral na dieta, em especial pelo selênio (ROEM; KOHLER; STICKNEY, 1990), suplementado na mistura mineral utilizada no estudo. O efeito antioxidante do selênio está relacionado à sua incorporação à enzima glutathiona peroxidase, que age nas membranas biológicas reduzindo hidroperóxidos, evitando a formação do radical alcoxil lipídico (BRIGELIUS-FLOHE, 1999; ARTEEL; SIES, 2001). O sítio ativo desta enzima contém seleniocisteína (STEINBRENNER et al., 2006). Em peixes, existe uma interação entre selênio e vitamina E de modo que a deficiência neste mineral pode reduzir o  $\alpha$ -tocoferol tecidual (BELL et al., 1985; GATLIN III; POE; WILSON, 1986).

Outro fator a ser levado em consideração nas análises dos efeitos da suplementação dietética no desempenho e possível aparecimento de sinais de deficiência de vitamina E no cachara é o fato que por mais criteriosas que tenha sido a metodologia de formulação e processamento da dieta semi-purificada – especialmente o uso óleo de milho isento em vitamina E, de farinha de peixe desengordurada e demais ingredientes purificados –, nas análises de doseamento de  $\alpha$ -tocoferol na ração basal foram detectados 3,40 mg de vitamina E  $\text{kg}^{-1}$  de ração. Apenas a impossibilidade de total depleção das reservas de vitamina E nos animais que iniciaram o experimento, mesmo no grupo que recebeu a dieta controle por 135 dias, i.e., agrupando os períodos de adaptação e experimental, já seria um efeito mascarador dos resultados. Em adição, em que pese o cuidado em testar aceitabilidade da dieta semi-purificada para o cachara antes do experimento, o inevitável uso de ingredientes purificados na formulação da dieta basal – caseína, gelatina e dextrina – interferiu no consumo alimentar, com consequente redução no crescimento, tendo em vista que a taxa de crescimento específico (TCE) média foi de 0,8 %  $\text{dia}^{-1}$  para este experimento, enquanto a TCE média relatada para cacharas na mesma classe de tamanho (peso inicial de 77,68 g) é de 1,5 %  $\text{dia}^{-1}$ , e bastante inferior ao valor de 3,3 %  $\text{dia}^{-1}$  observado para o pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (MARTINO et al., 2003).

Não foram registradas diferenças significativas para o índice hepatossomático entre os tratamentos. Estes resultados espelham relatos para a tilápia (SHEARER, 1994; TOCHER et al., 2002) e para o “halibut” do Atlântico (LEWIS-McCREA; LALL, 2007). Por outro lado, trutas arco-íris alimentadas com dietas não suplementadas com vitamina E apresentaram índice hepatossomático consideravelmente menor que os peixes que receberam suplementação dietética desta vitamina (PEARCE; HARRIS; DAVIES, 2003).

Além dos fatores nutricionais discutidos, outros fatores como tamanho, idade e taxa de crescimento, além dos fatores abióticos, influenciam a determinação do nível ótimo de vitaminas em dietas para peixes. Assim sendo, o desempenho não deve ser a única variável avaliada na determinação de exigências nutricionais de peixes. Outros parâmetros como o acúmulo de lipídeos, deformidades esqueléticas, atividades de enzimas específicas, deposição de vitaminas nos tecidos, sinais de deficiência, conteúdo lipídico do fígado, índice hepatossomático, grau de oxidação lipídica e respostas imunológica são usados para quantificar as exigências em vitaminas em organismos aquáticos (NRC, 2011). Por todos estes motivos, questões acerca de exigências em vitamina E são bastante discutidas e discutíveis.

Nas análises histológicas do fígado dos animais, procurou-se identificar patologias hepáticas, principalmente necroses e ceroides, a exemplo daquilo já relatado para peixes alimentados com dietas contendo níveis inadequados em vitamina E (MOCCIA et al., 1984; POSTON; COMBS, JR; LEIBOVITZ, 1976). No entanto, não foram diagnosticadas anormalidades e diferenças entre os tecidos nas diferentes amostras analisadas no presente estudo (Figura 10). Este resultado assemelha-se ao relatado para o “halibut” do Atlântico alimentado por 14 semanas com dietas contendo diferentes qualidades de lipídios e níveis de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol (LEWIS-McCREA; LALL, 2007).

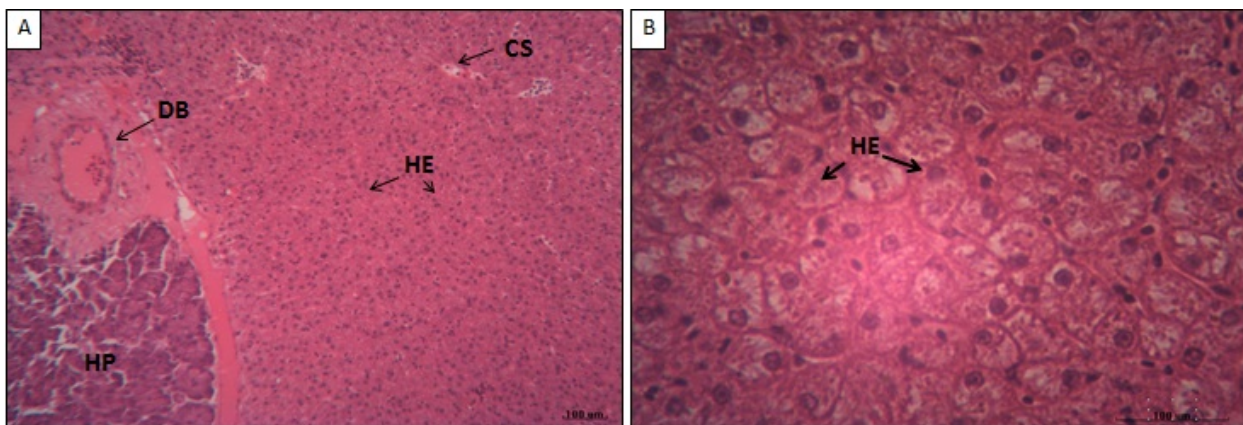


Figura 10 - Fotomicrografia do fígado de cachara alimentado com dieta com níveis de vitamina E; HP (hepatopâncreas), DB (ducto biliar), CS (canal sinusóide) e HE (hepatócitos). Objetiva de 10 vezes (A) e 40 vezes (B)

Nas análises do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol no fígado e filé do cachara verificou-se que existe deposição desta vitamina até a concentração dietética de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de ração, em ambos os tecidos (Figura 11). A partir desta concentração a deposição ocorre, mas com menor intensidade. Estes dados vão de acordo com o que vem sendo registrado para várias espécies de peixes (Tabela 15). Quando a deposição de vitamina E no filé atinge um platô, tendência

observada na Figura 11 tanto para o tecido muscular quanto o hepático, significa que o animal está em condições normais de saúde e metabólica. Caso esta deposição fosse de forma ascendente e contínua, significaria que o animal não possui limite de deposição e que o nível ainda é ineficiente. A vitamina E é distribuída sistemicamente no organismo animal e, em geral, existe uma relação linear entre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol dietético e o corpóreo, como o observado para bagre africano em dose até  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de ração (BAKER; DAVIES, 1996; COWEY; ADRON; YOUNGSON, 1983) e para o “rockfish” *Sebastes schlegeli*, mesmo percebendo um platô no fígado após a dose de  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  (BAI; LEE, 1998). Dados semelhantes foram encontrados para bagre do canal (BAI; GATLIN III, 1993) e truta arco-íris (COWEY; ADRON; YOUNGSON, 1983).

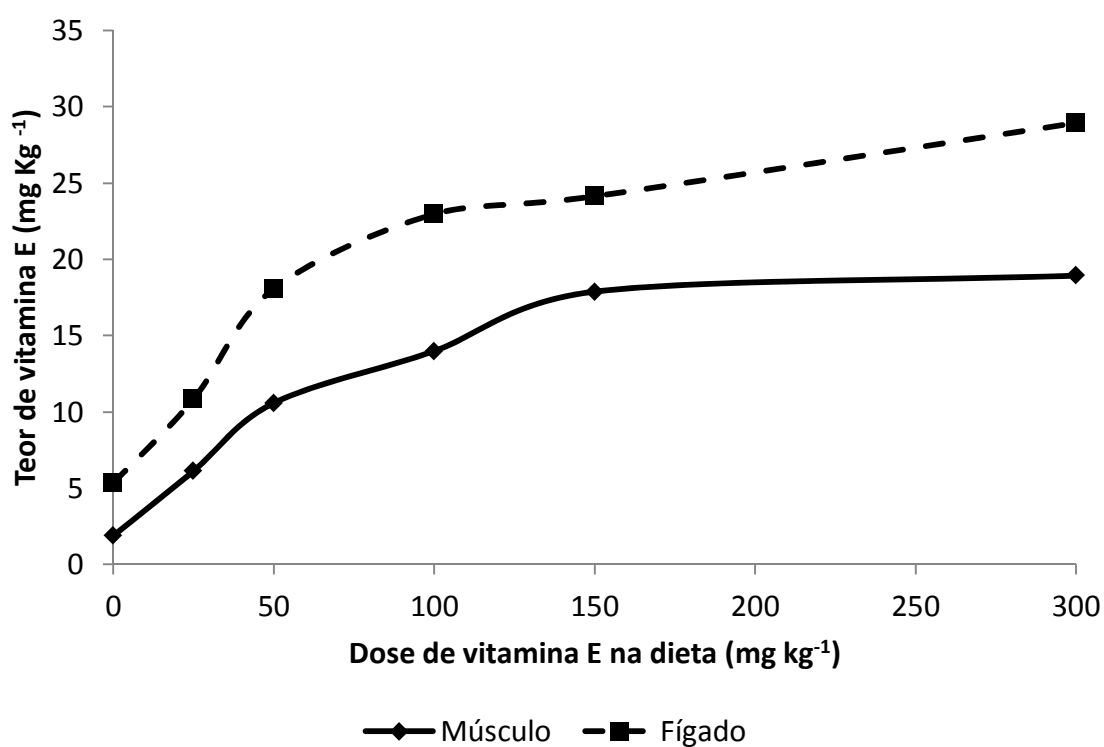


Figura 11 - Concentração de vitamina E determinada no fígado e músculo de cacharas alimentados com dietas com níveis de vitamina E

Tabela 15 - Concentração de  $\alpha$ -tocoferol no fígado e músculo para o cachara e outras espécies

Espécie	Período (semanas)	Doses (mg kg <sup>-1</sup> )	Músculo (mg kg <sup>-1</sup> )	Fígado (mg kg <sup>-1</sup> )	Referência
Truta arco-íris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	20	3,1	8,7	COWEY; ADRON; YOUNGSON, 1983
		100	6,9	105,1	
		0	3,9	9,7	
		20	5,3	11,2	
"Korean rockfish" <i>Sebastes schlegeli</i>	20	40	6,4	44	BAI, 1998
		60	8	59,9	
		120	5,3	103	
		500	93,1	93,1	
		0	nd	30	
		25	nd	60	
Peixe papagaio <i>Oplegnathus fasciatus</i>	12	50	nd	90	GALAZ; KIM; LEE, 2010
		75	nd	95	
		100	nd	100	
		500	nd	390	
		0	0,34	3,58	
		25	0,4	4,96	
"Grouper" <i>Epinephelus malabaricus</i>	8	50	0,56	8,06	YU-HUNG, 2005
		100	0,68	10,74	
		200	1,54	20,29	
		400	2,16	35,26	
		800	2,91	54,43	
		0	8,6	63,6	
Salmão "coho" <i>Oncorhynchus kisutch</i>	10	20	10,04	113,6	HUANG et al., 2004
		40	15,1	195	
		100	12,7	242	
		0	nd	0,17	
		10	nd	1,52	
"Sunshine bass" ( <i>M. chrysops</i> ♀ x ♂ <i>M. saxatilis</i> )	12	20	nd	2,86	KOCABAS; GATLIN III, 1999
		40	nd	4,61	
		60	nd	11,2	
		80	nd	11,5	
		0	1,88	5,33	
		25	6,13	10,84	
Cachara <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	12	50	10,58	18,06	Presente trabalho
		100	13,98	22,96	
		200	17,88	24,13	
		300	18,93	28,93	

\* nd = não determinado

### 4.3.3 Variáveis imunológicas

Proteína, albumina e globulina sérica

Não foi registrado efeito de níveis dietéticos de vitamina E nas variáveis proteína total e albumina sérica para o cachara. Por outro lado, o  $\alpha$ -tocoferol afetou positivamente o sistema imunológico, aumentando as globulinas séricas (Tabela 14, Figura 12), o melhor ajuste dos dados sendo uma equação quadrática [eq.(1)], em que  $vite$  = concentração de vitamina E. Conseqüentemente, o melhor valor estimado foi de 166,6 mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol, que resultou em 2,58 g dL<sup>-1</sup> de soro de globulina total. Esta mesma dose foi efetiva para as globulinas em truta (BLAZER; WOLKE, 1984).

$$\text{Globulinas totais} = 1,7441 + 0,009997 vite - 0,00003 vite^2 \quad (1)$$

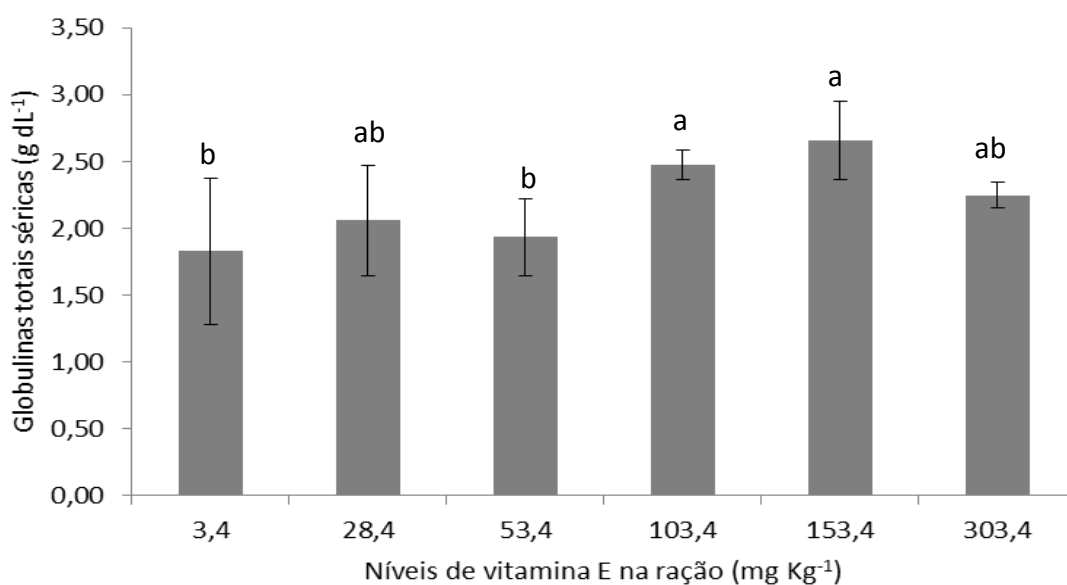


Figura 12 - Concentração de globulinas totais séricas em cacharas alimentados com níveis de vitamina E na ração ( $\mu \pm DP$ )

Normalmente, os valores de albumina e imunoglobulinas no soro aumentam com o uso de imunoestimulantes (CHOUDHURY et al., 2005). Em truta arco-íris a vitamina E influenciou a resposta do sistema imune em testes avaliando a resposta humoral e de resistência a desafio com *Yersinia ruckeri*. Embora os níveis de proteína sérica não tenham sido afetados pela dieta, o nível de globulina sérica foi mais alto no grupo que recebeu 160 mg de tocoferol por kg de ração (BLAZER; WOLKE, 1984). Os resultados registrados para o cachara neste estudo assemelham-se ao relatado por Blazer e Wolke (1984). No entanto, a

inclusão dietética de níveis crescentes de  $\alpha$ -tocoferol não afetaram os níveis de proteínas e globulinas plasmáticas do “sunshine bass” (SEALEY; GATLIN III, 2002). Por outro lado, o uso de vitamina E na concentração de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  de ração diminuiu imunoglobulinas totais séricas da truta arco-íris (CHEN et al., 2004).

#### Lisozima sérica

Para a determinação da concentração da lisozima a partir da atividade da lisozima sérica foi preciso obter a curva de calibração usando lisozima padrão (Figura 13). Não foi registrado efeito da vitamina E dietética sobre a atividade e concentração de lisozima sérica do cachara (Tabela 14). Resultados semelhantes foram encontrados para truta arco-íris (PUANGKAEW et al., 2004) e para “sunshine bass” (SEALEY; GATLIN III, 2002), mas a vitamina E afetou a concentração de lisozima sérica do “grouper” (*Epinephelus malabaricus*) (LIN; SHIAU, 2005).

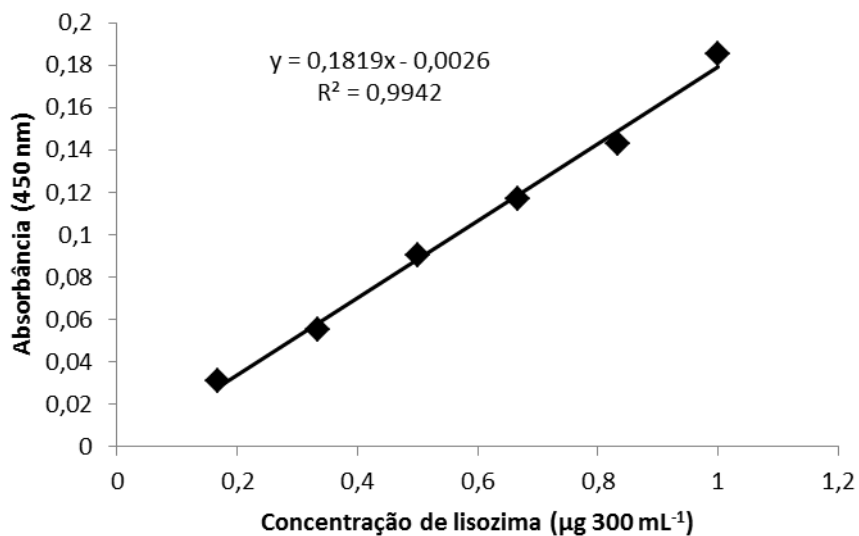


Figura 13 - Curva de calibração da lisozima

#### Atividade respiratória de leucócitos

Não foi verificado efeito da suplementação dietética com acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol sobre a atividade respiratória dos leucócitos para o cachara (Tabela 14). Resultado semelhante foi encontrado para truta arco-íris (BLAZER; WOLKE, 1984). Por outro lado, para peixe papagaio a atividade respiratória de leucócitos melhorou proporcionalmente ao aumento dos níveis de  $\alpha$ -tocoferol dietético, sendo que o nível máximo testado, 500 mg kg<sup>-1</sup> de ração, foi o que apresentou melhor atividade em 12 semanas (GALAZ; KIM; LEE, 2010). Resultados semelhantes foram relatados para grouper (LIN; SHIAU, 2005), para bagre do canal (YILDIRIM-AKSOY et al., 2008), para trutas arco-íris (KIRON et al., 2004; CLERTON et al., 2001), para “red drum” (PENG; GATLIN III, 2009), para dourada *Sparus aurata* (ORTUÑO et al., 2001; MULERO; ESTEBAN; MESEGUER, 1998) e para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (BELO et al., 2005). A interação entre as vitaminas C e E no aumento do *burst* oxidativo com a suplementação da vitamina E registrada para o “sunshine bass” está, possivelmente, relacionada à capacidade da vitamina C regenerar a vitamina E para a sua forma funcional (SEALEY; GATLIN III, 2002). No entanto, altas doses de vitamina E podem exercer efeito pró-oxidativo e não ser imunologicamente benéficas, como o observado em trutas alimentadas por nove semanas com 1000 mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por kg de ração (KIRON et al., 2004).

#### Resposta proliferativa celular leucocitária

A vitamina E dietética melhora a proliferação celular em animais, como relatado para ratos (SHAPIRO et al., 1994) e cães (LeBLANC et al., 2007). No entanto, não foi registrado efeito do acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol dietético sobre a proliferação de leucócitos isolados do sangue do cachara, tanto usando lipopolissacarídeo de *E. Coli* como estimulador da proliferação de linfócitos B, como para a proliferação de linfócitos T (Concanavalina-A como estimulador) (Tabela 14).

#### 4.4 Considerações finais

Em suma, a vitamina E apresentou efeito sobre o sistema imunológico do cachara, aumentando as glubulinas séricas, sendo a melhor dose dietética 166,6 mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por quilograma de ração. Houve estabilização na deposição de vitamina E entre 100-150 mg de acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol por quilograma de ração. Portanto, a dose ótima



determinada neste experimento em relação à imunoestimulação também proporciona, com certa eficiência, disponibilização e acúmulo de vitamina E no filé, o que pode influenciar na sua qualidade. No entanto, as demais variáveis analisadas, tanto relacionadas ao desempenho quanto ao sistema imunológico, não foram alteradas.

Tendo em vista que poucos trabalhos existem com a espécie *P. fasciatus*, este trabalho abre precedente interessante, pois determina a melhor dose de vitamina E para estímulo do sistema imunológico da espécie. Ao mesmo tempo, serve como estudo base e como incentivo na busca pela necessária continuidade das pesquisas para o desenvolvimento da criação do cachara. A este respeito, estudos com outros nutrientes precisam ser feitos para contribuir ainda mais para o entendimento da importância da vitamina E para esta espécie, principalmente relacionado com associações desta vitamina com a vitamina C e o selênio.

## Referências

- ABREU, J.S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com  $\alpha$ -1,3-glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura.** 2007. 123p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2007.
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, Amsterdam, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (editors). **Diseases in Asian Aquaculture II**. Metro Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 1995. p. 185-202.
- ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 10, p. 153–158, 2001.
- BAI, S.C.; GATLIN III, D.M. Dietary vitamin E concentration and duration of feeding affect tissue  $\alpha$ -tocopherol concentrations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 113, p. 129–135, 1993.
- BAI, S.C.; LEE, K.-J. Different levels of dietary DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, p. 405-414, 1998.
- BAKER, R.T.M.; DAVIES, S.J. Changes in tissue  $\alpha$ -tocopherol status and degree of lipid peroxidation with varying  $\alpha$ -tocopheryl acetate inclusion in diets for the African catfish. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 71-79, 1996.

- BELL, J.G.; COWEY, C.B.; ADRON, J.W.; SHANKS, A.M. Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 53, p. 149–157, 1985.
- BELO, M.A.A; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; SOARES, V.E.; OTOBONI, A.M.M.B.; MORAES, J.E.R. Effect of Dietary Supplementation with Vitamin E and Stocking Density on Macrophage Recruitment and Giant Cell Formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 133, p. 146–154, 2005.
- BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E. The effects of a-tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson), **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, p. 1-9, 1984.
- BOWNIK, A. In vitro effects of staphylococcal leukocidin LukE/LukD on the proliferative ability of lymphocytes isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 656-659, 2006.
- BRIGELIUS-FLOHE, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 27, p. 951–965, 1999.
- BUITRAGO-SUÁREZ, U.A.; BURR, B.M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, Auckland, v.1512, p. 1–3, 2007.
- CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Spix & Agassiz, 1829) e outras espécies do gênero e seus híbridos. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2 ed. Santa Maria:Editora da UFSM, 2010. p. 335-382.
- CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DRABOWSKI, K.; LEE, K. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 242, p. 553-569, 2004.
- CHOUDHURY, D.; PAL, A.K.; SAHU, N.P.; KUMAR, S.; DAS, S.S.; MUKHERJEE, S.C. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in carpa indiana (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 3, p. 281-291, 2005.
- CHRISTIANSEN, R.; GLETTE, J.; LIE, Ø.; TORRISSEN, O.J.; WAAGBØ, R. Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed semipurified diets with and without astaxanthin supplementation. **Journal of fish Diseases**, Oxford, v. p. 18, 317–328, 1995.
- CLERTON, P.; TROUTAUD, D.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; DESCHAUX, P. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and head kidney leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 11, p. 1-13, 2001.
- COWEY, C.B.; ADRON, J.W.; YOUNGSON, A. The vitamin e requirement of rainbow trout (*Sala gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, p. 85-93, 1983.

ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C; ANDERSON, D.P.; ROBERTSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B. **Techniques in Fish Immunology**. Fair Heaven: SOS Publications, 1990. p. 101-103.

FRISCHKNECHT, R.; WAHLI, T.; MEIER, W. Comparison of pathological changes due to deficiency of vitamin C, vitamin E, and combinations of vitamin C and E in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 17, p. 31–45, 1994.

GALAZ, G.B.; KIM, S.S.; LEE, K.J. Effects of different dietary vitamin E levels on growth performance, non-specific immune responses, and disease resistance against *Vibrio anguillarum* in Parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul . v. 23, n. 7, p. 916-923, 2010.

GAO, J.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; MAMAUAG, R.E.P.; HAN, Y. Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood for red seabream *Pagrus major*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 356-357, p. 73-79, 2012.

GATLIN III, D.M.; POE, W. E.; WILSON, R. P. Effects of stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E-deficient fingerling channel catfish **Aquaculture**, Amsterdam, v. 56, p. 187–195, 1986.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 179-187, 2006.

HALVER, J.E. The vitamins. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish Nutrition** 3<sup>rd</sup> ed. San Diego;Academic Press, 2002, p. 61-141.

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, Ø. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Free Radical Biology and Medicine**. Philadelphia, v. 22, p. 137–149, 1997.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. Fish health aspects in grouper aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 320, p. 1-21, 2011.

HUANG, C.; HIGGS, D.A.; BALFRY, S.K.; DEVLIN, R.H. Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, New York, v. 139, p. 199– 204, 2004.

KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; ISHIZAKA, K.; SATOH, S.; WATANABE, T. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, p. 361-379, 2004.

KLEIN, J. **Immunology**. Cambridge: Blackwell Scientific Publications, 1990. 508p.

KOCABAS, A.M.; GATLIN III, D.M. Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female x *M. saxatilis* male). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 5, p. 3-7, 1999.

KUSUDA, R.; KAWAI, K. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. **Fish Pathology**, Oxford, v. 33, p. 221-227, 1998.

LeBLANC, C.J.; DIETRICH, M.A.; HOROHOW, D.W.; BAUER, J.E.; HOSGOOD, G., MAULDIN, G.E. Effects of dietary fish oil and vitamin E supplementation on canine lymphocyte proliferation evaluates using a flow cytometric technique. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 119, p. 180-188, 2007.

LEE, K.J.; DABROWSKI, K. Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). Br. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 89, p. 589-596, 2003.

\_\_\_\_\_. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 230, p. 377-389, 2004.

LEWIS, J. M.; WU, C.H; BERG, H.; LEVINE, J. H. The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, Bethesda, v. 95, p. 905-928, 1980.

LEWIS-McCREA, L.M.; LALL, S.P. Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the development of skeletal abnormalities in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 262, 142-155, 2007.

LI, G.; GUO, Y.; ZHAO, D.; QIAN, P.; SUN, J.; XIAO, C.; LIANG, L.; WANG, H. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, p. 212-217, 2006.

LIN, Y.H.; SHIAU, S.Y. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses, **Aquaculture**, Amsterdam, v. 248, p. 235-244, 2005.

LUNDÉN, T.; MIETTINEN, S.; LÖNNSTRÖM, L.G.; LILIUS, E.M.; BYLUND, G. Influence of oxitetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 8, p. 217-230, 1998.

MAQSOOD, S.; SAMOON, M.H.; SINGH, P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 9, p. 111-120, 2009.

MARTINO, R.C.; TRUGO, L.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L. Use of White fat as a replacement for squid liver oil in practical diets for surubim *Pseudoplatystoma corruscans*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 34, p. 192-202, 2003.

MOCCIA, R.D.; HUNG, S.S.O.; SLINGER, S.J.; FERGUSON, H.W. Effect of oxidized oil, vitamin E and ethoxyquin on the histopathology and haematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 7, p. 269-282, 1984.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC - **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington: The National Academies Press, 2011. 392p.

NAVARRO, R.D.; FERREIRA, W.M.; RIBEIRO FILHO, O.P.; VELOSO, D.P.; FONTES, D.O.; SILVA, R.F. Desempenho de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementada com vitamina E. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 59, n. 226, p. 185-194, 2010.

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

PANUSH, M.F.; DELAFUENTE, J.C. Vitamins and immunocompetence. **World Review Nutrition Dietetic**, Basel, v. 45, p. 97-123, 1985.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de Peixes – Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1999. 311p.

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

PENG, L.I.; GATLIN III, D.M. Dietary vitamin E requirement of the red drum *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.15, p. 313–319, 2009.

POSTON, H.A.; COMBS, G.F.J.; LEIBOVITZ, L. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of *Atlantic salmon* (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 106, p. 892–904, 1976.

PUANGKAEW, J.; KIRON, V.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; SATOH S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 16, p. 25-39, 2004.

PULSFORD, A.L.; CRAMP, M.; LANGSTON, A.; GLYNN, P.J. Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and Vitamin E on the immune system of flatfish. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 5, p. 631-643, 1995.

RIJKERS, G.T.; TEUNISSEN, A.G.; VAN OOSTEROM, R.; MUISWINKEL, W.B. The immune system of cyprinid fish, the immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.) **Aquaculture**, Amsterdam, v. 19, p.177-189, 1980.

ROEM, A.J.; KOHLER C.C.; STICKNEY, R.R. Vitamin E Requirements of the Blue Tilapia, *Oreochromis uureus* (Steindachner), in Relation to Dietary Lipid Level. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 87, p. 155-164, 1990.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 41, p. 66-75, 2010.

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

SAKAI, M.; KOBAYASHI, M.; KAWAUCHI, H. In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v.151, p.113–118, 1996.

SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Requirement of Tilapia for a-tocopherol. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v. 53, p. 119- 124, 1987.

SAU, S.K.; PAUL, B.N.; MOHANTA, K.N.; MOHANTY, S.N. Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (*Labeo rohita*) fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 240, p. 359-368, 2004.

SCHRECK, C. B.; MOYLE, P.B. **Methods for Fish Biology**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. 684p.

SEALEY, W.M.; GATLIN III, D.M. 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. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, p. 748-755, 2002.

SHAPIRO, A.C.R.D.; WU, D.M.D.; HAYEK, M.G.; MEYDANI, M.D.V.M.; MEYDANI, S.N.D.V.M. Role of eicosanoids and vitamin E in fish oil induced changes of splenocyte proliferation to T cell mitogen. **Nutrition Research**, New York, v.14, n. 9, p. 1339-1354, 1994.

SHEARER, K.D. Factors affecting the proximate cultured fishes with emphasis composition of salmonids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 119, p. 63-88, 1994.

SHIAU, S.-Y.; LAN, C.-W. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 145, p. 259-266, 1996.

SINHA, A.; SINHA, Y.K.P. Role of vitamin E in growth of an Indian major carp, catla (*Catla catla*). **Journal of Indian Fisheries Association**, Kerala, v. 24, p. 91–96, 1994.

STEINBRENNER, H.; ALILI, L.; BILGIC, E.; SIES, H.; BRENNEISEN, P. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 40, p. 1513–1523, 2006.

TOCHER, D.; MOURENTE, G.; VAN DEREECKEN, A.; EVJEMO, J.; DIAZ, E.; BELL, J.G.; GEURDEN, I.; LAVENS, P.; OLSEN, Y. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L., halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. and sea bream *Sparus aurata* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 8, p. 195-207, 2002.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; MATSUI, M.; OGINO, C.; KAWABATA, T. Effects of a-tocopherol deficiency on carp: VII. The relationship between dietary levels of linoleate and a-tocopherol requirement. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, Tokyo, v. 43, p. 935– 946, 1977.

WILSON, R.P.; BOWSER, P.R.; POE, W.E. Dietary vitamin E requirement of fingerling channel catfish. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, p. 2053-2058, 1984.

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