PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA VIADANNA

**Uso de imunostimulante *Saccharomyces cerevesiae* em peixes da
espécie *Cyprinus carpio***

São Paulo

2012

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA VIADANNA

**Uso de imunoestimulante *Saccharomyces cerevesiae* em peixes da
espécie *Cyprinus carpio***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

De acordo: _____

Orientadora

São Paulo

2012

Obs.: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2548
FMVZ

Viadanna, Pedro Henrique de Oliveira
Uso de imunestimulante *Saccharomyces cerevisiae* em peixes da espécie
Cyprinus carpio / Pedro Henrique de Oliveira Viadanna. -- 2012.
77 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.

8. Imunestimulante. 2. *Cyprinus carpio*. 3. Carpa. 4. Mananoligosacarídeo.
5. Peixe. 6. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso de imunostimulante *Saccharomyces cerevisiae* em peixes da espécie *Cyprinus carpio*", protocolado sob o nº 1983/2010, utilizando 40 (quarenta) carpas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/09/2010.

We certify that the Research "Use of the immunostimulant *Saccharomyces cerevisiae* in fish species *Cyprinus carpio*", protocol number 1983/2010, utilizing 40 (forty) carps, under the responsibility Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/29/2010.

São Paulo, 22 de novembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VIADANNA, Pedro Henrique de Oliveira

Título: Uso de imunoestimulante *Saccharomyces cerevesiae* em peixes da espécie *Cyprinus carpio*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. (a) _____

Instituição: _____

Prof. Dr. (a) _____

Instituição: _____

Prof. Dr. (a) _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho à minha noiva, por ter sempre me apoiado com seu amor incondicional.

Dedico aos meus pais, por serem minha inspiração.

Dedico aos peixes, que em sua diversidade, me instigam às profundezas do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, pela orientação, confiança, sábios conselhos e amizade.

À minha noiva, Cristiana Nelise de Paula Araujo, pelo seu amor e dedicação, me ajudando em todas as etapas do mestrado com trabalho árduo e companheirismo.

A toda minha família, que são uma parte do que sou hoje.

A família da Cristiana por todo apoio e compreensão.

Ao Jorge Oyakawa, pela amizade, pelos conselhos e pela ajuda, que foram fundamentais na realização do projeto.

Ao Luciano Bugalho “Buga” pela imensa ajuda na confecção das lâminas histológicas.

Aos amigos do LAPCOM, que me ajudaram e pesquisaram junto comigo as mais variadas enfermidades de animais silvestres, agradeço por todo conhecimento compartilhado.

Aos amigos do LAPOA, do CAUNESP, em especial à Profa. Dra. Fabiana Pilarski, ao Dr. Róberson Sakabe, à mestranda Thais Heloisa Vaz Farias e ao Prof. Dr. Dalton Carneiro, que me ensinaram muito sobre patologia de peixe, além de a ração experimental ter sido elaborada e feita por eles.

Ao Prof. Dr. Nilton Lincopan e à Maria Jacinta de Faria do Laboratório de Resistência Bacteriana, do ICB-USP, pelas análises e cultivo microbiológico, além da cepa ATCC 7966 de *A. hydrophila*, oriunda da Faculdade de Saúde Pública da USP gentilmente doada pela Dra. Maria Helena Matté, através da doutoranda Milena Dropa.

Ao Dr Marcello “passarinho”, da UNESP Jaboticabal pelo fornecimento de MOS.

Ao Grupo “Peixe também é Bicho”, pelo apoio financeiro para a obtenção dos animais, equipamentos e testes limnológicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

“ To live is the rarest thing in the world. Most people exist, that is all.”

Oscar Wilde

RESUMO

VIADANNA, P.H.O. **Uso de imunoestimulante *Saccharomyces cerevesiae* em peixes da espécie *Cyprinus carpio***. [Feed with immunostimulant *Saccharomyces cerevesiae* for fishes of the specie *Cyprinus carpio*]. 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O aquarismo é uma atividade mundialmente difundida e um segmento extremamente grande da indústria de animais de estimação. O Brasil, em 2007, exportou o valor de US\$ 5.871.576,73 em peixes. Devido à biologia dos peixes, todo seu manejo pode desencadear uma resposta fisiológica de estresse, que, dependendo da duração, tipo e espécie de manejo leva a uma resposta imunossupressora, que pode acarretar doença e morte aguda e consequentemente grande prejuízo à produção desses animais. O uso de imunoestimulantes, como suplementação dietética pode prover defesa inata e resistência a patógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização de mananoligossacarídeo de levedo de cerveja (*Saccharomyces cerevesiae*), como imunoestimulante adicionado à ração oferecida a peixes da espécie *Cyprinus carpio* durante 45 dias. Para avaliar a imunidade dos peixes, foram feitas avaliações hematológicas periódicas e, no final do período determinado, os peixes foram desafiados imunologicamente com estresse e infectados com *Aeromonas hydrophila*. As carpas do grupo controle tiveram uma taxa de crescimento de 0,05 g/dia, conversão alimentar de 14,09 e eficiência protéica de 0,25, enquanto o grupo imunoestimulado obteve a taxa de crescimento de 0,11g/dia, conversão alimentar de 6,15 e eficiência protéica de 0,57. Não houve diferença estatística entre o resultado da hematologia dos animais do grupo controle e do grupo imunoestimulado. Dos animais infectados experimentalmente, 88% morreram em menos de 24 horas por choque endotóxico e, no exame *post mortem*, não houve diferença entre os grupos. A carpa que recebeu alimentação controle e foi infectada teve anemia macrocítica normocrômica, trombocitopenia, linfopenia, monocitose e aumento do número de CGE. A carpa que recebeu alimentação com MOS, foi infectada e sobreviveu, não apresentou alteração nos parâmetros hematológicos. A ração com MOS foi zootecnicamente melhor para a nutrição das carpas. Com

base na taxa de sobrevivência e na avaliação hematológica, não há como responder se a ração suplementada com MOS foi imunologicamente melhor do que a ração controle.

Palavras-chave: Carpa.. Hematologia.. Infecção.. Patologia.. Piscicultura.. Probiotico.

ABSTRACT

VIADANNA, P.H.O. VIADANNA, P.H.O. **Feed with immunostimulant *Saccharomyces cerevesiae* for fishes of the specie *Cyprinus carpio***. [Uso de imunoestimulante *Saccharomyces cerevesiae* em peixes da espécie *Cyprinus carpio*] 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The aquarium hobby is an activity worldwide spread and a segment extremely large of the pet industry. Brazil, in 2007, exported an amount of US\$ 5.871.576,73 of fishes. Due to the biology of the fishes, all its management can trigger a physiological response leading to stress, that depending on the duration, type and specie, can conclude in immunosuppressive response, leading to disease and acute death, creating a great prejudice. The use of immunostimulants, as dietary supplementation may provide an innate defense against pathogens. This study aims to evaluate the feasibility of using mannan oligosaccharide of brewer yeast (*Saccharomyces cerevesiae*) as immunostimulants added to the feed for koi fishes (*Cyprinus carpio*) during 45 days. To evaluate the immunity of the fishes, periodic hematologic evaluations were made and at the end of the determined period, the fishes were immunologically challenged with stress and inoculation with *Aeromonas hydrophila*. The control group had a growth rate of 0,05g/day, feed conversion of 14,09 and protein efficiency ratio of 0,25, while the treatment group had growth rate of 0,11g/day, feed conversion of 6,15 and protein efficiency ratio of 0,57. The hematological results showed no statistical difference between the control group and immunostimulant group according. Analyzing the experimental infected animals, 88% died within 24 hours, due to endotoxic shock, and in the *post mortem* examination, there were no difference between groups. The koi that received control feed and it was infected had macrocytic normochromic anemia, thrombocytopenia, lymphopenia, monocytosis and increased of special granulocytic cells. The koi that received the MOS feed, was infected with *A. hydrophila* and survived, had no alteration on haematological parameters. The feed with MOS was zootechnical better than the control feed to carps. Based on the rate of survival and hematology, there are no possibility of answering if supplemented feed with MOS was immunologic better than control feed.

Keywords: Aquaculture.. Carp.. Hematology.. Mannanoligosaccharide.. Pathology.. Probiotic..

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 - Gráfico representando o peso animal em cada grupo, ao longo do tempo de experimentação. Barras em preto significam carpas suplementadas com MOS; barras em branco animais com ração controle; eixo y correspondente ao peso em gramas, eixo x, dia da avaliação - São Paulo (SP) - 2011.....	48
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fórmula e composição calculada da dieta experimental controle e da dieta tratamento para carpas - São Paulo (Jaboticabal) - 2011.....	40
Tabela 2 - Avaliação dos índices zootécnicos de carpas com dietas suplementadas com MOS e dieta controle - São Paulo (SP) – 2011.....	49
Tabela 3 - Avaliação de médias e desvios-padrões (DP) em relação ao hematócrito, à proteína total, ao número total de eritrócitos e de leucócitos do grupo controle e o do grupo tratamento, durante o período experimental - São Paulo (SP) – 2011.....	50
Tabela 4 - Avaliação de médias e desvios-padrões (DP) em relação à hemoglobina, ao volume corpuscular médio (VCM), à hemoglobina corpuscular média (HCM) e à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), do grupo controle e o do grupo tratamento, durante o período de experimentação - São Paulo (SP), 2011.....	50
Tabela 5 - Avaliação de médias e desvios-padrões (DP) em relação à concentração de trombócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos do grupo controle e do grupo tratamento, durante o período de experimentação - São Paulo (SP) – 2011.....	51
Tabela 6 - Avaliação de médias e desvios-padrões (DP) em relação à concentração de células granulocíticas especiais (CGE), eosinófilos e basófilos do grupo controle e do grupo tratamento, durante o período de experimentação - São Paulo (SP) – 2011.....	51
Tabela 7 - Parâmetros biométricos e hematimétricos de duas carpas que sobreviveram à inoculação experimental por <i>A. hydrophila</i> durante 24 horas, sendo uma do grupo controle e outra do grupo tratamento - São Paulo (SP) - 2011.....	52
Tabela 8 - Percentual de lesões observadas na histologia de 18 carpas inoculadas experimentalmente com <i>A. hydrophila</i> - São Paulo (SP) – 2011.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma da produção de peixes e invertebrados ornamentais.....	20
Figura 2 -	Relações Filogenéticas dos peixes.....	24
Figura 3 -	Esquema de desenvolvimento de células sanguíneas em teleósteos. A: célula retículo-endotelial; B: célula tronco desenvolvida pela célula retículo-endotelial; C: hemoblasto linfóide; D: divisão do hemoblasto linfóide; E: pequenos hemoblastos linfóides; F: mitose do eritroblasto imaturo; G: eritroblasto; H reticulócito; I: eritrócito; J prógranulócito de grânulos grosseiros; K: prógranulócitos de grânulos finos; L e M: mitoses dos pró-granulócitos; N e O: granulócitos de grânulos grosseiros e finos; P: linfócitos; Q: Trombócito.....	27
Figura 4 -	Desenho ilustrativo do delineamento experimental. As carpas foram divididas randomicamente em quatro grupos: um grupo que foi suplementado com MOS, e inoculado com <i>A. hydrophila</i> ; um grupo que foi suplementado com MOS e inoculado com solução fisiológica estéril; um grupo com alimentação controle, que foi inoculado com <i>A. hydrophila</i> e um último grupo que recebeu alimentação controle e foi inoculado com solução fisiológica.....	39
Figura 5 -	Desenho esquemático da câmara de Neubauer com as áreas predefinidas para a contagem de células sanguíneas.....	42
Figura 6 -	Carpa apresentando hemorragia cutânea em região de nadadeiras caudal, peitoral, e anal (setas). Barra equivalente a 2 cm - São Paulo (SP) – 2011.....	52
Figura 7 -	Carpa apresentando área esbranquiçada na pele, com formato irregular, que circunscrevia o local da inoculação de <i>A. hydrophila</i> (seta). Barra equivalente a 2 cm - São Paulo (SP) – 2011.....	53
Figura 8 -	Necropsia de carpas. Animais 1, 2 e 3 infectados experimentalmente com <i>A. hydrophila</i> . O animal 4 é um animal controle. Barra equivalente a 2cm - São Paulo (SP) – 2011.....	53

Figura 9 -	Corte histológico de baço de carpa com congestão. HE - São Paulo (SP) - 2011.....	54
Figura 10 -	Corte histológico de baço de carpa com congestão. Ilustração 1: visualização geral do órgão; ilustração 2: detalhamento do pâncreas no interior do baço (seta). HE - São Paulo (SP) – 2011.....	55
Figura 11 -	Corte histológico da cartilagem branquial de carpa apresentando parasita do gênero <i>Centrocestus</i> (seta). HE - São Paulo (SP) - 2011.....	55
Figura 12	Corte histológico do intestino de carpa apresentando parasita do gênero <i>Botriocephalus sp.</i> (seta). HE - São Paulo (SP) - 2011.....	56

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
LB	Luria-Bertani
MC	MacConkey
nm	Nanômetro
Å	Ångström
UI	Unidades Internacionais
mL	Mililitro
MOS	Mananoligossacarídeo
L	Litro
h	Hora
mg	Miligrama
cm ²	Centímetro quadrado
fL	Fentolitro
pg	Picograma
g	Grama
dL	Decilitro
g	Gravidade
CGE	célula granulocítica especial
FOS	Frutoligossacarídeo
GOS	Glucoligossacarídeo
UFC	Unidade formadora de colônia
ATCC	American Type Culture Collection
OMP	proteínas da membrana externa
cm ³	Centímetro cúbico
ECP	Produto Extracelulare

MAS	Motile aeromonad septicemia
°C	Graus Celsius
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
Ig	Imunoglobulina
CRF	Fator liberador de corticotrofina
POMC	Proopiomelanocortina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
α -MSH	Hormônio α -melanócito-estimulante
NK	Natural Killer (Matadora natural)
NCC	linfócitos citotóxicos não específicos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
Céls	Células
BHT	Antioxidante
HE	Hematoxilina-Eosina
He	Eritrócitos
Ht	Hematócrito
Hb	Hemoglobina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVO	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	SOBRE PEIXES.....	24
3.2	SOBRE A CARPA (<i>CYPRINUS CARPIO</i>).....	25
3.3	SOBRE HEMATOLOGIA DE PEIXES.....	26
3.4	SOBRE IMUNOLOGIA EM PEIXES.....	29
3.5	SOBRE DOENÇAS BACTERIANAS EM PEIXES.....	31
3.6	SOBRE IMUNOESTIMULANTES.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	ANIMAIS.....	38
4.2	PERÍODO.....	38
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.4	FORMULAÇÃO DAS DIETAS.....	40
4.5	ASPECTOS CLÍNICOS LABORATORIAIS.....	41
4.6	GANHO DE PESO E CONVERSÃO ALIMENTAR.....	43
4.7	DESAFIO IMUNOLÓGICO, COLHEITA DE AMOSTRAS E AVALIAÇÃO FINAL.....	44
4.8	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA <i>POST MORTEM</i>	44
4.9	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	44
4.10	ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA.....	46
4.11	PREPARAÇÃO DE INÓCULO.....	47
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS	48
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O aquarismo é uma atividade mundialmente difundida e um segmento extremamente grande da indústria de animais de estimação (WINFREE, 1989), que gera, pela via legal segundo a FAO (1996-2005) uma renda direta de aproximadamente US\$ 278 milhões. Em 2008, os Estados Unidos apresentaram um gasto de US\$ 2,05 bilhões em produtos para peixes ornamentais (APPA). A estimativa com relação ao número mundial de proprietários de peixes ornamentais gira em torno de 30 milhões, destes, 28,5 milhões seriam donos de peixes de água continental (WABNITZ et al., 2003), devido a isto, a maior parte dos peixes de aquário comercializados internacionalmente, são constituídas por espécies de água continental (95%) (DAWES, 1998a, b).

Os maiores compradores de peixes ornamentais e invertebrados são os Estados Unidos (EUA), a União Europeia (tendo a Alemanha como maior compradora) e o Japão (BASSLEER, 1995). O Brasil foi o sexto maior exportador para a União Europeia em 1998 (WHITTINGTON et al., 2000) e o décimo para os EUA (BASSLEER, 1995).

Os peixes ornamentais são coletados do meio ambiente ou cultivados em fazendas aquáticas, em uma complexa rede industrial (Figura 1). O Brasil, assim como a Colômbia e o Peru, na América do Sul, é conhecido como um país que exporta majoritariamente peixes coletados do meio ambiente.

Em 2006, o Brasil, exportou US\$ 4.691.989,03 (IBAMA, 2006) de peixes de água continental, já em 2007 houve um aumento e exportou o valor de US 5.871.576,73 (IBAMA, 2007a; IBAMA, 2007b), o que significa em números de peixe, 27.526.438 peixes, sendo a espécie mais exportada a *Paracheirodon axelrodi*, conhecida como cardinal tetra. Em 2007, os peixes marinhos exportados representaram uma renda total de US\$ 826.264,34 (IBAMA, 2007c).

A metodologia comumente empregada para a captura é caracterizada como rudimentar e não sustentável (LIVENGOOD; CHAPMAN, 2007), pois, de maneira geral, a maioria dos peixes capturados são jovens e portanto, não atingiram a maturidade sexual, o que possivelmente compromete a manutenção dos estoques (IBAMA, 2000; BARRETO, 2002).

Fonte: Livengood e Chapman, The Ornamental Fish Trade: An Introduction with Perspectives for Responsible Aquarium Fish Ownership, 2007.

Figura 1 - Fluxograma da produção de peixes e invertebrados ornamentais.

A reprodução e o cultivo de algumas das espécies mais comumente usadas na aquariofilia representam uma ferramenta sustentável em substituição à atividade extrativista, pois, valoriza o criador, diminui a biopirataria, gera renda, diminui impactos ambientais e gera impostos que podem ser revertidos em ações institucionais, que elevam a qualidade de vida (MEIRELLES, 2008).

A grande dificuldade do cultivo de espécies de peixes ornamentais consiste na grande variedade biológica dessas espécies. Segundo Cato e Brown (2003), há por volta de 1539 espécies, e mesmo nas mais populares, a falta de conhecimento para um bom manejo da aquicultura, gera eventuais surtos de doenças e isso representa para o produtor/aquariofilista prejuízo econômico e desânimo com relação à atividade.

Não há estudos sobre a relação do aparecimento de doenças em peixes de aquário e a perda de interesse na atividade pelo aquarista. Entretanto nos meios de discussão sobre o assunto - via internet, fóruns, congressos e cursos afins - essa questão é muito discutida, pois, para se montar um aquário, o proprietário faz um investimento elevado. O que acontece, geralmente quando um animal fica doente? Primeiro, ele é descartado e outro irá repô-lo. Porém, o

proprietário vai comprar um peixe substituto na mesma loja em que comprou o que morreu, o aquário continua o mesmo e, assim, ele perpetua, comumente, a mesma enfermidade nos peixes que cria. Então, depois de algum tempo vários peixes ficam doentes, ele se utiliza do conhecimento leigo para comprar um medicamento para o peixe, e com esse uso indiscriminado de medicamento, a doença dos animais pode persistir e produzir a morte dos mesmos. Por isso, o aquarista se desanima e não quer ter mais um aquário: perda de dinheiro, de tempo e uma frustração por não conseguir criar peixes saudáveis.

Analisando o parágrafo anterior, observa-se que a falta de conhecimento de manejo aliado a uma forte tendência de redução de gastos geram descrédito em torno da atividade aquarista. Uma das maneiras de evitar o mau manejo é oferecer ao aquariófilo a oportunidade de fazer cursos e ser orientado por profissionais qualificados.

Por sua vez, o uso de antibióticos e quimioterápicos para profilaxia e tratamento de doenças na aquicultura é intensamente criticado pelos seus impactos negativos como, por exemplo, a acumulação de drogas em tecidos, a resistência bacteriana e a imunossupressão (RIJKERS et al., 1980). Como alternativa para algumas doenças, vacinas foram desenvolvidas e tiveram sucessos variáveis, pois o grande espectro de patógenos em peixes limita bastante o efeito das vacinas (ROBERTSEN, 1999). Sendo assim, uma medida ecologicamente correta de prevenção de doenças seria por meio da utilização de pré-/pro-bióticos como imunoestimulantes (RAA et al., 1992).

O uso de imunoestimulantes, como suplementação dietética pode prover defesa inata e a resistência a patógenos durante períodos de grande estresse, como os provocados durante o transporte de larvas, o manejo nos tanques, as variações climáticas, a vacinação e a reprodução. Além disso, pouco se conhece sobre o comportamento fisiológico dos peixes ornamentais frente à utilização de imunoestimulantes; e acredita-se que tal pesquisa será de grande importância, uma vez que o aquarismo é um mercado extremamente rentável, porém fragilizado pela ocorrência de doenças em peixes ornamentais, que causam prejuízos tanto para o produtor como para o consumidor. Devido à biologia dos peixes, todo seu manejo pode desencadear uma resposta fisiológica de estresse, que dependendo da duração, tipo e espécie de manejo, pode levar a uma resposta imunossupressora, acarretar doença e morte aguda e com isso gerar grande prejuízo à criação desses animais (SADO; MATUSHIMA, 2007). O esclarecimento desses processos imunológicos em peixes poderá elucidar a evolução do sistema imune inato e adaptativo, além de

proporcionar a prevenção de doenças de maneira menos prejudicial para o meio ambiente (BRICKNELL; DALMO, 2005).

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar eficiência da utilização de Mananoligossacarídeo de levedo de cerveja (*Saccharomyces cerevesiae*), como imunoestimulante-probiotico adicionado à ração e oferecido a peixes ornamentais adultos da espécie *Cyprinus carpio* durante 45 dias. Também teve como objetivo a avaliação imunológica das carpas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sobre peixes

A definição do que é peixe é muito tênue, afinal, a superclasse *Piscis* é a mais numerosa entre os vertebrados, constituindo algo em torno de 28 mil espécies (POUGH; JANIS; HEISER, 2006). Dentro das relações filogenéticas dos cordados atuais, poderíamos estabelecer a seguinte hierarquia para os peixes (Figura 2).

Fonte: Pough; Janis; Heiser. *Vertebrate life*, 2006.

Figura 2 - Relações Filogenéticas dos peixes.

Nos peixes Agnathas (sem mandíbula) ou Ciclostomos (com boca circular), encontramos animais não vertebrados (feiticeiras), que são estritamente marinhos e distribuídos em dois gêneros (*Eptatretus* e *Myxine*), e também as lampreias (*Petromyzon* e *Lampreta*) que já são vertebrados verdadeiros. Dentro dos Gnathostomata (com maxilas), encontramos a classe dos

Condrichthyes (peixes cartilagosos), que se dividem em dois grupos, os Neoselachii (tubarões e raias) e o Holocephali (quimeras).

Os Osteichthyes (peixes ósseos) têm como divisões principais os Sarcopterygii (peixes com nadadeiras carnosas), em que encontramos os Coelacanthiformes, Dipnoi (peixes pulmonados), Osteolepimorpha (Rhipidistian), e os Actinopterygii (peixes de nadadeiras raiadas).

Actinopterygii é o grupo com maior número de espécies dentro dos vertebrados (algo em torno de 27 mil), habitam 73% do planeta e segundo McCune (1996) têm uma taxa evolutiva mais rápida que as aves e alguns insetos. Distribuem-se taxonomicamente nos seguintes grupos: Polypteriformes (forma de muitas nadadeiras, “bichirs”); Acipenseriformes (esturção e peixe espátula); Neopterígeos primitivos (Lepisosteiformes (escama de osso, “gars”) e Amiiformes (“Bowfin”); e Teleostei que se dividem em 20 superordens (Osteoglossomorpha, Elopomorpha, Clupeomorpha, Ostariophysi, Protacanthopterygii, Stenopterygii, Cyclosquamata, Scopelomorpha, Lampridiomorpha, Polymyxiomorpha, Paracanthopterygii, Acanthopterygii), sendo 40% das espécies de peixes pertencem ao clado Acanthopterygii e 28% ao clado Ostariophysi.(NELSON, 2006).

3.2 Sobre a carpa (*Cyprinus carpio*)

As carpas coloridas têm a seguinte filogenia:

Reino: Animalia
 Filo: Chordata
 Subfilo: Vertebrata
 Infrafilo: Gnathostomata
 Superclasse: Piscis
 Classe: Osteichthyes
 Subclasse: Actinopterygii
 Neopterygii
 Infraclasse: Teleostei
 Superordem: Ostariophysi

Ordem: Cypriniforme
Superfamília: Cyprinoidea
Família: Cyprinidae
Subfamília: Cyprininae
Gênero: *Cyprinus*
Espécie: *Cyprinus carpio*

A origem das carpas é dúbia; no entanto, há relatos de criação de carpas na China datados de 475 a.C., o que nos faz pensar que sua origem vem de lá. O nome “carpa” foi dado por Aristóteles, que além de filósofo, era ictiólogo. Em grego, carpa é *kyprinos*, que também era um dos nomes da deusa Afrodite (BALON, 1995)

A maior produção de peixe de água doce no mundo é de ciprinídeos. Em 1993, era de 7,5 milhões de toneladas. Em 2009, aumentou para 22,2 milhões de toneladas, o que equivale a aproximadamente US\$ 29,4 bilhões (FAO, 2010).

As carpas estão presentes na alimentação humana, com quatro espécies de ciprinídeos entre as dez mais consumidas do mundo: carpa comum, carpa capim, carpa cabeçuda e carpa prateada. É um grupo importante na pesca esportiva, pesquisa genética e como animais de estimação (THONEY; LOISELLE; SCHLAGER, 2003).

Segundo a classificação de Gosline¹ (1971 *apud* SADO, 2004), a família na qual pertencem as carpas (Ciprinidae) corresponde ao grupo de peixes primitivos, tendo sua origem no período Jurássico e diversificação no Mesozoico.

3.3 Sobre Hematologia de peixes

Os valores hematológicos dos peixes podem ser afetados por fatores bióticos e abióticos, como idade, sexo, alimentação, processos infecciosos, qualidade da água e temperatura.

¹ GOSLINE, W.A. Functional morphology and classification of teleostean fishes. Honolulu: The University Press of Hawaii, 1971, 208p.

Os eritrócitos são células sanguíneas que têm como principal função o transporte de oxigênio para os tecidos. Em carpas adultas (*Cyprinus carpio* L.) a concentração de eritrócitos varia de $1,69$ a $1,91 \times 10^6/\mu\text{L}$ (TRIPATHI; LATIMER; BURNLEY, 2004). Os peixes têm os eritrócitos nucleados e os eritrócitos de carpas têm dimensões que variam de $10\text{-}12\ \mu\text{m}$ de largura por $3\text{-}4\ \mu\text{m}$ de altura.

Os principais órgãos responsáveis pela hematopoiese são rim, timo e baço. O desenvolvimento dos eritrócitos inicia-se com a diferenciação de células mesenquimais do estroma retículo-endotelial (célula tronco chamada hemoblasto linfoide), transformando-o em um pequeno hemoblasto linfóide (bem basofílico, peroxidase negativo). Depois, diferencia-se em eritroblasto, (com citoplasma levemente acidofílico, peroxidase positivo e com capacidade mitótica). Em seguida, desenvolve-se em reticulócito e, por fim, em eritrócito (Figura 3).

Fonte: Catton. Blood cell formation in certain teleost fishes. Blood, v. 6, p. 39-60, 1951.

Figura 3. Esquema de desenvolvimento de células sanguíneas em teleósteos. A: célula retículo-endotelial; B: célula tronco desenvolvida pela célula retículo-endotelial; C: hemoblasto linfóide; D: divisão do hemoblasto linfóide; E: pequenos hemoblastos linfóides; F: mitose do eritroblasto imaturo; G: eritroblasto; H reticulócito; I: eritrócito; J prógranulócito de grânulos grosseiros; K: prógranulócitos de grânulos finos; L e M: mitoses dos pró-granulócitos; N e O: granulócitos de grânulos grosseiros e finos; P: linfócitos; Q: Trombócito.

Nos peixes são encontrados trombócitos, que são equivalentes às plaquetas de mamíferos, com funções de coagulação sanguínea e de participação no sistema imune inato (STOZIK et al., 2002). Seus formatos variam de esférico a oval, com núcleos alongados, e citoplasma que cora fracamente (TRIPATHI; LATIMER; BURNLEY, 2004). De acordo com o trabalho de Stosik et al. (2002), trombócitos de carpa são capazes de “fagocitar” *Staphylococcus aureus* e matar as bactérias fagocitadas.

Os leucócitos dividem-se em linfócitos, monócitos e granulócitos e têm como principal função a defesa do organismo a estímulos, tanto externos como internos e em carpas, são encontrados quatro tipos de células granulocíticas em sangue periférico, com distinção celular visível por meio de colorações do tipo Romanowsky (AINSWORTH, 1992).

De acordo com Tavares-Dias, Sandrim e Campos-Filho (1999) e também Tavares-Dias et al. (2004), os neutrófilos são células predominantemente arredondadas, com citoplasma acidófilo ou anfótero, geralmente abundante. O núcleo é predominantemente excêntrico, podendo ser bilobulado ou não. Os linfócitos são predominantemente arredondados e de tamanho variado. O citoplasma não evidencia granulações visíveis, sendo fortemente basofílico. O núcleo possui forma arredondada, com cromatina densa, relação núcleo-citoplasma grande. As células granulocíticas especiais são arredondadas, seu citoplasma é abundante e rico em granulações claras, transparentes e esféricas, que se espalham homogeneamente; o núcleo é pequeno e excêntrico. Os monócitos são células grandes de formato esférico, ocasionalmente arredondados ou com certo grau de polimorfismo. Seu citoplasma é intensamente basofílico e, na maioria das vezes com prolongamentos citoplasmáticos e vacuolização. O núcleo é geralmente excêntrico e alongado. O basófilo é caracterizado pelos grânulos bastante basofílicos, e núcleo geralmente excêntrico. Segundo Tripathi, Latimer e Burnley (2004), o eosinófilo tem núcleo irregular e contém cromatina fina, levemente condensado. O citoplasma é moderadamente basofílico e contém alguns grânulos grandes, formato de arroz, de cor vermelha.

Segundo Walencik e Witeska (2007), que avaliaram a relação de anticoagulantes e seu uso em hematologia de carpas, o Na₂EDTA não é recomendado para a avaliação de parâmetros

de células sanguíneas da série vermelha por induzirem anisocitose, anisonucleose e hemólise em todas as concentrações. A heparina, na diluição 10 UI mL⁻¹, foi o anticoagulante mais versátil para carpas.

Svobodová et al. (2008) avaliaram 20 raças diferentes de carpas (*Cyprinus carpio*) e constatou que as carpas derivadas da raça Amur selvagem tinham valores hematológicos mais altos que as demais. Raças com escamas tipo espelho tinham valores hematológicos mais altos que raças escamosas e os machos tinham valores sanguíneos mais altos do que as fêmeas.

Segundo Tripathi, Latimer e Burnley (2004), os valores de referência de hematologia para carpas saudáveis são: 29,73-33,86% de hematócrito; 6,32-7,55 g dL⁻¹ de hemoglobina; 1,69-1,91 x 10⁶ µL de eritrócitos; 166,3-190 fL de volume corpuscular médio (VCM); 37,7-42,7 pg de hemoglobina corpuscular média (HCM); 20,4-22,9 g dL⁻¹ de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); 19,8-28,1 x 10³ µ/L de leucócitos; 14,7-23,5 x 10³ µ L⁻¹ de linfócitos; 0,46-0,96 x 10³ µ L⁻¹ de monócitos; 1,57-3,9 x 10³ µ L⁻¹ de neutrófilos; 0,69-1,57 x 10³ µ L⁻¹ de basófilos.

3.4 Sobre imunologia em peixes

Como em qualquer animal, as defesas contra microorganismos consistem didaticamente em barreiras físicas, imunidade inata e imunidade adaptativa (TIZARD, 2009), mas essas defesas se interrelacionam. Peixes teleósteos desenvolveram um sistema imune muito efetivo: produzem substâncias (lisozima, lectina e proteases, segundo PALAKSHA et al., 2008) que agem como uma barreira bioquímica, prevenindo a invasão de patógenos, secundariamente, quando patógenos ultrapassam esta barreira, mecanismos de defesa celular são ativados.

Os peixes são os primeiros vertebrados que desenvolveram um sistema imune inato e adaptativo. Eles não possuem medula óssea como órgão imune primário, mas possuem células hematopoiéticas na parte cefálica do rim, que produz tanto células de linhagem mieloide como de linhagem linfoide (VAN MUISWINKEL, 1995). Os peixes também não têm linfonodos como órgão imunológico secundário. O baço e a parte cefálica do rim são sítios de interação do sistema imunológico, com antígenos e produção de anticorpos de linfócitos. O timo atua como centro de

maturação de linfócitos T e o sistema imune de mucosas está relacionado a superfícies epiteliais como trato digestório, brânquias e pele, os quais formam a primeira linha de defesa.

O tipo principal de células do sistema imune inato de teleósteos são as células mieloides, granulócitos neutrofílicos e macrófagos (de um monócito precursor), células que têm como função principal a fagocitose. Estas células migram para um sítio de infecção/inflamação e matam bactérias e células infectadas (GOMEZ; BALCAZAR, 2008). Os linfócitos citotóxicos não específicos (NCC) podem matar as células infectadas, sendo equivalentes às células NK (Natural Killers – Matadoras Naturais) de mamíferos (FISCHER et al., 2006), ou por produção de enzimas/proteínas bactericidas ou líticas (MAGNADOTTIR, 2006).

A resposta pró-inflamatória em peixes é caracterizada por uma primeira onda de TNF- α e IL-1 β , seguida pela expressão de quimiocinas e um pico de IL-12 (CHADZINSKA et al., 2008). O TNF- α é produzido principalmente, pelas células da parte cefálica do rim e pelas brânquias. Pode ser induzido por estimulação de LPS em macrófagos da parte cefálica do rim, determinando a resistência para infecções por controle intracelular de patógenos e, assim, replicando e induzindo proliferação de imunestimulantes.

Peixes teleósteos têm diferentes isótipos de imunoglobulinas, se comparados com mamíferos. Depois de um desafio imunológico, a imunoglobulina mais encontrada é a molécula tetramérica de IgM. Outras formas são relatadas, como IgD, IgZ, IgT e a forma químera IgM-IgZ. As funções de cada uma dessas formas de Ig em peixes ainda estão sendo investigadas (HANSEN et al., 2005; SAVAN et al., 2005).

O fator liberador de corticotrofina (CRF) foi encontrado em células do tipo-macrófago em brânquias e na pele de peixes (MAZON et al., 2006). A proopiomelanocortina (POMC), derivados de peptídeos de adrenocorticotrófico (ACTH), β -endorfina e o hormônio α -melanócito-estimulante (α -MSH) foram encontrados no timo de kinguios (OTTAVIANI et al., 1995). Nos leucócitos, o hormônio do crescimento e a expressão de prolactina foram confirmadas (YADA, 2007). Outros hormônios clássicos, como leptina I e II foram encontrados no timo e no baço (HUISING et al., 2006).

A parte cefálica do rim dos peixes tem, simultaneamente, constituição de órgão imunológico e endócrino, com tecido hematopoiético situado adjacente ao tecido endócrino, criando um exemplar de localização de interações neuroendócrino-imunes. As células cromafins da parte cefálica do rim produzem catecolaminas, enquanto que as células interrenais produzem

cortisol, ao mesmo tempo que as linhagens linfoides (linfócitos B e T) e mieloide (fagócitos) estão sendo produzidas (VAN MUISWINKEL, 1995). O cortisol inibe a quimiotaxia e a fagocitose em macrófagos de kinguios e, também, inibe fortemente a atividade de *burst* respiratório (WANG; BELOSEVIC, 1995).

Os centros melano-macrofágicos são um grupo específico de células pigmentadas, que são encontradas em animais ectotérmicos e estão localizadas no baço, no rim e no fígado. Podem desenvolver-se em situações de inflamação crônica e atresia ovariana. Em teleósteos superiores, esses centros são análogos aos centros germinais de linfonodos dos mamíferos, contendo, assim, linfócitos e macrófagos. Têm função inicial de captura e depósito de ferro (quando o animal está com doenças hemolíticas), a captura de antígeno e a apresentação para linfócitos, o sequestro de produtos da degradação celular e de materiais potencialmente tóxicos fazem parte de sua lista de atuações (AGIUS; ROBERTS, 2003).

Dentro do contexto celular, podemos citar ainda os mastócitos que têm funções similares aos mastócitos de mamíferos, e as células tipo bastonetes (Rodlet cells), existentes apenas em peixes, que parecem estar envolvidas na proteção do organismo contra agentes nocivos e helmintos e são encontradas principalmente em brânquias e tecido intestinal (REITE; EVENSEN, 2006).

3.5 Sobre doenças bacterianas em peixes

Dentro do conjunto de peixes ornamentais de água doce, as carpas são as mais cultivadas em aquacultura. Contudo, as perdas históricas devido às infecções nos sistemas intensivos e semi-intensivos permearam a margem de US\$ 7,035 milhões entre 1992-1995 (LILLEY et al., 2002). Nos países asiáticos que têm como hábito a criação de carpas, doenças como a aeromoníase, provocada pela *Aeromonas hydrophila*, furunculose e edwardsiellose; são as mais frequentes (KARUNASAGAR et al., 1991).

A microbiota normal do peixe é refletida da população bacteriana da água em que vive (SAKATA; OKABAYASHI; KAKIMOTO, 1980). *A. hydrophila* é um agente ubíquo, oportunista, Gram-negativo, formato de bastonete, pertencente à família Vibrionaceae, (HAZEN

et al., 1978² *apud* HARIKRISHNAN et al. 2008), que podem causar a doença clínica devido a fatores imunossupressores, como: superpopulação; baixa concentração de oxigênio e/ou alta concentração de compostos orgânicos dissolvidos na água; injúrias físicas; mudanças abruptas de temperatura; reprodução; excesso de manuseio; transporte; e outros processos imunossupressores e processos infecciosos (LEUNG et al., 1994). Os sinais clínicos característicos são: ulceração cutânea; petéquias; exoftalmia e distensão celomática (HARIKRISHNAN; RANI; BALASUNDARAM, 2003).

Aeromonas pertencem a um gênero bacteriano muito comum em peixes, sendo a *Aeromonas hydrophila* um agente patogênico para animais ectotérmicos e homeotérmicos, incluindo o homem (SALTON; SCHNICK, 1973; FRAIRE, 1978). É encontrada em água e solo, com exceção de águas extremamente salinas. São citocromo oxidase positivo, reduzem nitrato. Suas colônias são geralmente brancas a amarelo-clara, circulares, crescem em 24 horas na temperatura de 22-28 °C. A temperatura mínima para crescimento é de 0-5 °C; a máxima 45° C e a temperatura ótima é de 25-30 °C (SHARIFPOUR, 1997).

Podem resultar, nos peixes, em uma síndrome chamada MAS (Motile aeromonad septicemia), comumente causada por *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas caviae*. Sinais clínicos incluem hemorragias e úlceras cutâneas, hemorragias viscerais, edema, ascite e exoftalmia (PALMEIRO; ROBERTS, 2010). Outra doença relacionada à *Aeromonas hydrophila* é a dermatite ulcerativa em carpas que resultam em lesões ulcerativas da pele com diversidade de sinais como, por exemplo, perda de escamas ou elevadas, eritemas e úlceras que podem expor musculatura e ossos. O estresse osmótico pela perda da integridade epidérmica pode resultar em retenção de fluidos, exoftalmia e celomite (PALMEIRO; ROBERTS, 2010).

Após a instalação da infecção, o crescimento bacteriano é rápido e a produção de produtos extracelulares (ECP's) - toxinas, hemolisinas α e β , enterotoxinas, fator citotóxico, aerolisinas, nucleases, gelatinase, caseinases, elastases, lipases, lecitinases, proteases e acetilcolinesterases (MITTAL et al., 1980; LEUNG; STEVENSON, 1988) - podem causar danos sistêmicos irreparáveis, levando à morte. Além das ECP's, outros fatores de virulência contribuem para o estabelecimento da infecção, como a presença da proteína de superfície S, OMP's (proteínas da membrana externa), pili, fimbrias, hemaglutinina, plasmídeo e fatores de resistência sérica

² HAZEN, T.C., FLIERMANS, C.B., HIRSCH, P., ESCH, G.W. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the USA. Journal of Applied Environmental Microbiology, v. 36, p. 731-738, 1978.

(LEUNG et al., 1994; SHARIFPOUR, 1997). Leung et al. (1994) determinaram algumas características de virulência em 18 cepas de *A. hydrophila*, mas apenas uma, a ATCC7966 (American Type Culture Collection), não era proveniente de peixes doentes. A cepa ATCC7966 foi isolada do leite.

Snieszko e Axelrod (1971) classificaram a doença causada por *A. hydrophila* em quatro categorias:

- 1) aguda, septicemia rápida e fatal, com poucos sinais clínicos.
- 2) aguda com ascite, abscedação e protrusão de escamas.
- 3) forma ulcerativa crônica, com furúnculos e abscessos.
- 4) forma latente sem sinais clínicos.

Grizzle e Kiryu (1993) descreveram que a necrose hepática está associada e é mais severa em peixes com MAS. Miyazaki e Jo (1985) encontraram em ayu (*Plecoglossus altivelis*) naturalmente infectados, congestão hepática de sinusoides. Os hepatócitos perderam gordura e estavam levemente atrofiados, mas não havia invasão bacteriana intra-celular. No baço, foi visualizada congestão seguida de hemorragia e destruição de tecido. No rim, havia necrose tubular sem invasão bacteriana e os sinusoides hematopoiéticos estavam extensivamente congestos e hemorrágicos. A musculatura cardíaca estava bastante edemaciada. Havia congestão de estômago e ceco pilórico e não havia alteração nas brânquias e no cérebro.

Garcia e Moraes (2009) estudaram sinais clínico-patológicos em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados experimentalmente por *Aeromonas hydrophila*. Observaram petéquias e sufusões na superfície corporal, acompanhadas de distensão celomática, congestão e hemorragia no fígado, rim cefálico e baço. Os níveis de proteína total e globulinas do sangue, após o desafio, foram reduzidos, com um aumento no número de eritrócitos e uma diminuição de eritroblastos. Ocorreu, também, após infecção, neutrofilia, monocitofilia, leucopenia, linfocitopenia e trombocitopenia.

O aumento do número de leucócitos (de $3,15 \times 10^4 \pm 0,14$ no dia zero para $4,72 \times 10^4 \pm 0,22$ no dia 30) e a diminuição da contagem de eritrócitos (de $2,31 \times 10^6 \pm 0,16$ no dia zero para $1,67 \times 10^6 \pm 0,12$ no dia 30), hematócrito ($33,60 \pm 3,20$ vol. Eritrócitos 100cm^{-3} nos animais controle no dia zero, para $18,83 \pm 1,60$ vol. Eritrócitos 100cm^{-3} no dia 30) e hemoglobina (de $10,37 \pm 0,61$ g dL⁻¹ no dia zero para $5,60 \pm 0,42$ g dL⁻¹ no dia 30), foram os resultados do trabalho

de Harikrishnan, Rani e Balasundaram (2003) com carpas experimentalmente infectadas por *A. hydrophila* (6×10^6 - 10^{10} UFC mL⁻¹), avaliadas 10, 20 e 30 dias pós-inoculação.

Foi demonstrado por Xiang et al. (2008) que o lipopolissacarídeo (LPS), componente estrutural de bactérias Gram-negativas, induzem apoptose de linfócitos em *Carassius auratus*, levando a uma imunossupressão e evidenciando alguns aspectos da patogênese de infecções bacterianas em peixes.

Brenden e Huizinga (1986) descrevem as mudanças patofisiológicas da infecção experimental de $1,5 \times 10^7$ UFC de *A. hydrophila* em peixe dourado (*Carassius auratus*): no local em que foi inoculada a bactéria, houve hemorragia e necrose na musculatura (de moderada a severa). Encontraram também vários graus de degeneração e necrose hepática, necrose de glomérulos e de túbulos do rim medial, e hipoplasia de polpa vermelha no baço. Coração e intestino não tiveram alterações.

Schroers et al. (2009) tiveram como resultado que a infecção por *A. hydrophila* provocou aumento de glicoproteínas do muco entérico, mas houve uma diminuição do peso molecular das glicoproteínas, o que faz com que haja uma diminuição do efeito de lavar do muco intestinal (mecanismo adaptativo de remoção de bactérias pela secreção de mucinas de diferentes pesos moleculares). No entanto, segundo os autores, essa modulação varia de acordo com a cepa estudada.

Marel et al. (2010) analisaram que em corpos hídricos com alta concentração de *A. hydrophila*, os peixes (neste caso, as carpas) aumentam a secreção cutânea de moléculas pesadas de glicoproteínas e também a glicosilação.

3.6 Sobre imunoestimulantes

Imunoestimulantes são compostos químicos, sintéticos ou biológicos com capacidade de aumentar a resistência a doenças por meio do estímulo do sistema imune inespecífico e específico (MULERO et al., 1998; SADO, 2008). Na aquacultura comercial, de acordo com Sakai (1999), imunoestimulantes podem ser divididos de acordo com sua origem: bacteriano, derivado de alga, derivado de animais, fatores nutricionais como imunoestimulantes, e hormônios/citocinas. De

acordo com Bricknell e Dalmo (2005) “o imunoestimulante é um composto de ocorrência natural que modula o sistema imune, aumentando a resistência do animal contra doenças”.

São particularmente importantes durante estágios juvenis, antes do desenvolvimento completo do sistema imune ou quando o manuseio é impraticável. O efeito dos imunoestimulantes é por mecanismos não específicos (PEDERSEN; GILDBERG; OLSEN, 2004), não há formação de memória imunológica e o período de resposta é considerado limitado. Estresse pode causar imunossupressão (ELLIS, 2001) e imunoestimulantes deveriam ser aplicados preventivamente ao estresse ou à exposição de patógenos (ANDERSON, 1992). Determinar o período de aplicação é imperativo, pois o uso prolongado de imunoestimulantes pode reduzir o *status* imunológico de peixes (SAKAI, 1999). Em fazendas aquícolas, imunoestimulantes são usados tanto como adjuvantes quanto como suplementos alimentares.

Injeção intraperitoneal é a via mais eficiente de administração de imunoestimulantes em peixes (LILLEHAUG, 1989; DALMO; SELJELID, 1995), mas a administração oral é mais fácil e menos laboriosa, podendo tratar vários indivíduos simultaneamente sem estressar os animais (RAA, 1996).

O termo “probiótico” é originário das palavras gregas “*pro*” e “*bios*”, que significam “para a vida” (GISMONDO et al., 1999). Os probióticos são promotores de vida no sentido que melhoram de maneira geral o estado de saúde do organismo receptor. (NAYAK, 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde/Organização de Comida e Agricultura (WHO/FAO), probióticos são organismos vivos que quando administrados em doses adequadas, podem melhorar a vida do animal (FAO, 2001).

Prebióticos são alimentos não digestíveis que afetam benéficamente seu consumidor por meio de estimulação de crescimento e/ou atividade de uma ou mais bactérias intestinais (RINGØ et al., 2010), além de estimulação imunológica não específica. São exemplos de prebióticos os mananoligossacarídeos (WHITE et al., 2002), a lactose (SZILAGYI, 2002), a oligofrutose e a inulina (TEITELBAUM; WALKER, 2002).

Entre os prebióticos de maior destaque científico, estão os frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS). Os FOS são polímeros de frutose de cadeia curta, não digestíveis, resistentes à hidrólise, que alcançam o cólon intacto e fornecem substrato para a microbiota (ROBERFROID, 1996). GOS e MOS são obtidos a partir de parede celular de leveduras (BALLOU, 1970). Durante os processos de proliferação microbiana, as

bactérias aderem-se às células epiteliais, ligando-se a elas por meio de uma fimbria em sítios de ligação específicos ricos em resíduos de manose (MILES, 1993). Os prebióticos têm a capacidade de usar essa semelhança entre os sítios de ligação dos enterócitos ricos em manose com os mananologossacarídeos adicionados à dieta, diminuindo a fixação de patógenos na mucosa e facilitando a sua expulsão com o quimo alimentar através do trato gastrointestinal por mecanismos fisiológicos normais (FLEMMING, 2005).

Os MOS apresentam alta afinidade ligante e oferecem um sítio ligante competitivo para bactérias patógenas Gram-negativas, que apresentam a fimbria tipo 1 específica para oligossacarídeos (FLEMMING, 2005). Leslie (1996) verificou que, ao contrário da maioria dos patógenos, a microbiota benéfica pode utilizar os mananologossacarídeos como fonte de energia.

Suplementação alimentar com MOS em carpa (*C. carpio* - STAYKOV, 2004), truta arco-íris (*Salmo gairdneri irideus* G. - STAYKOV; SPRING; DENEV, 2006), bagre do canal (*Ictalurus punctatus* - WELKER et al., 2007), truta arco-íris (*Oncorhynchus Mykiss* - STAYKOV et al., 2007) e badejo (*Dicentrarchus labrax* - TORRECILLAS et al., 2007) resultou no aumento da resistência à infecção bacteriana e a estressores comuns.

Culjak et al. (2004) em pesquisa com jovens de carpa (*Cyprinus carpio*), descreveram que a adição de 0,6% de mananologossacarídeo na dieta durante 46 dias resultou em maior crescimento, maior absorção de proteínas e aumento na taxa de sobrevivência, quando comparadas ao grupo controle.

Sado, Bicudo e Cyrino (2008) mostraram que em tilápias (*Oreochromis niloticus*), a melhor concentração de MOS na alimentação é a de 0,4%, pois, conforme aumentaram a concentração de MOS, o índice de ingestão alimentar piorou. Mostraram também que não houve diferença nos índices hematimétricos entre o grupo controle e o grupo suplementado.

Em frangos de corte, Hofacre et al. (2003) utilizaram MOS como medida preventiva de enterite necrotizante por *Clostridium perfringens*, e obteve uma redução de 71% de mortalidade comparado com grupo animal sem tratamento.

O glucan isolado da parede celular do *Saccharomyces cerevisiae* foi usado por Robertsen et al. (1990) para aumentar a resistência contra *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* e *Aeromonas salmonicida* em salmão do atlântico (*Salmo salar*). Chen e Ainsworth (1992) usaram injeções de *Saccharomyces cerevisiae* para aumentar a resistência contra *Edwardsiella ictaluri* em bagre do

canal (*Ictalurus punctatus* Rafinesque). Conforme Rumsey et al. (1990), também pode ser usado de maneira satisfatória como fonte de proteína em peixes.

O papel dos oligossacarídeos como mecanismo de defesa em organismos vegetais e fúngicos é um fenômeno bem estabelecido (RADMAN, et al., 2003). Em peixes tem sido observado que a adição de oligossacarídeos na dieta promove melhora da resposta imune (SIWICKI et al., 1994; ORTUÑO et al., 2002), um aumento da taxa de crescimento (LARA-FLORES et al., 2002) e promove saúde em geral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

A espécie escolhida foi a carpa comum (*Cyprinus carpio*). Foram utilizados 36 espécimes, sendo 14 machos e 22 fêmeas, pesando em média, 161,91 gramas cada espécime, obtidos do Aquário de Itaquera, São Paulo/SP, que foram mantidos em quatro tanques com biomassa inicial de $5,53 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$. Houve trocas parciais de água diárias, sem exposição solar direta, com temperatura variando de 26,9° C a 19,7° C, tendo média de 23,48° C.

O experimento foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação no Uso de Animais da FMVZ/USP, protocolo número 1983/2010, sendo aprovado por esta comissão.

4.2 Período

O experimento ocorreu entre os dias 29 de outubro a 12 de dezembro de 2011.

4.3 Delineamento Experimental

Inicialmente, os peixes foram identificados por fotografia, permitindo assim, individualização das análises. Os peixes foram alimentados por 45 dias. Não houve separação por sexo, pois não havia como identificar o sexo de cada carpa *in vivo*. Um grupo de 18 carpas recebeu uma ração controle, e outro grupo de 18 carpas recebeu ração com 0,3% de mananoligossacarídeo de *Saccharomyces cerevisiae* como imunoestimulante, sendo que esta concentração e o período de alimentação foram sugeridos pelos Drs. Fabiana Pilarski e Róberson Sakabe. Durante esse período, foram avaliados os valores hematimétricos e biométricos em

quatro momentos: ao primeiro, décimo quinto, trigésimo e quadragésimo sexto dia de experimento, sendo assim, os dados gerados foram individualizados, não necessitando de repetição.

Ao quadragésimo quinto dia, os animais passaram pelo estresse de captura durante cinco minutos, e, depois, nove animais de cada grupo foram inoculados pela via intracelomática com 1 mL de *Aeromonas hydrophila*, na concentração de 3×10^7 UFC mL⁻¹. Os outros nove animais de cada grupo foram inoculados pela via intracelomática com 1 mL de solução fisiológica estéril, como controle para verificar se as alterações são causadas realmente pela *A. hydrophila* ou são apenas devido ao fator lesivo da inoculação (Figura 4). No quadragésimo sexto dia, os animais foram pesados, mensurados e foi coletado sangue deles para hematologia. No quadragésimo sétimo dia, todos os animais que sobreviveram foram eutanasiados, necropsiados e seus órgãos coletados para avaliações histopatológica e microbiológica.

Figura 4. Desenho ilustrativo do delineamento experimental. As carpas foram divididas randomicamente em quatro grupos: um grupo que foi suplementado com MOS, e inoculado com *A. hydrophila*; um grupo que foi suplementado com MOS e inoculado com solução fisiológica estéril; um grupo com alimentação controle, que foi inoculado com *A. hydrophila* e um último grupo que recebeu alimentação controle e foi inoculado com solução fisiológica.

4.4 Formulação das dietas

As dietas têm sua formulação e composição representada pela Tabela 1. A dieta controle e tratamento são isoproteicas, isofosfóricas e isocalóricas. A dieta foi elaborada pelos Profs. Drs. Dalton J. Carneiro Roberson Sakabe, ambos da UNESP-Jaboticabal. Todos os ingredientes foram misturados duas vezes, processados em aparelho para produção de pellets, secados por 24 horas em estufa, quebrados para a formação do pellet, ensacados e armazenados em freezer convencional até seu uso.

Tabela 1 – Fórmula e composição calculada da dieta experimental controle e da dieta tratamento para carpas - São Paulo (Jaboticabal) - 2011.

Ingredientes (g Kg ⁻¹ de peso seco)	Controle	Tratamento
Farinha de peixe ¹	165	165
Farinha de soja 45%	330,5	330,5
Milho	250	247
Farelo de trigo	190	190
Óleo de Soja	30	30
Fosfato bicálcico ²	15	15
Calcário ³	13	13
Suplemento Mineral e Vitamínico ⁴	5	5
Vitamina C ⁵	0,3	0,3
Antifúngico ⁶	1,2	1,2
MOS ⁷	0	3
Composição calculada aproximada (g Kg ⁻¹ peso seco)		
Matéria seca	894,1	
Proteína bruta	280,5	
Extrato etéreo	65,7	
Matéria mineral	68	
Fibra bruta	47,7	
Extratos não-nitrogenados	407,7	
Energia bruta	4086kcal kg ⁻¹	
Cálcio	19,6	
Fósforo	8,9	

¹Farinha de peixe Rubi, Rio de Janeiro, Brasil (PB: 614 g Kg⁻¹, EE: 89,2 g Kg⁻¹)

²Fosfato Bicálcico, (Fósforo 189 g Kg⁻¹, Cálcio 259,6 g Kg⁻¹)

³Calcário Santa Helena, Minas Gerais, Brasil (Cálcio 380 g Kg⁻¹, Magnésio: 5 g Kg⁻¹)

⁴Suplemento Mineral e Vitamínico Premix Fri-ribe, São Paulo, Brasil

⁵Vitamina C, Base Química de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

⁶Antifúngico, Banox E (BHT: 100 g Kg⁻¹, BHA: 10 g Kg⁻¹, Etoxiquim 10 g Kg⁻¹)

⁷MOS, ActiveMOS, Biorigin, São Paulo, Brasil

4.5 Aspectos clínicos laboratoriais

Os animais foram capturados usando rede de coleta de 20cm² de diâmetro de aro e inseridos em aquário de 2 litros para sedação, utilizando 50mg L⁻¹ de óleo de cravo (VELISEK et al. 2005). Os animais foram posicionados de maneira cômoda para fazermos a coleta de sangue pela veia caudal. Amostras sanguíneas foram coletadas por meio de punção da veia caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 1 mL, previamente umedecidas com solução de heparina 5000 UI, com volume coletado de 0,04 mL. Foram avaliados os índices hematimétricos absolutos e suas variáveis, contagem diferencial de leucócitos e a contagem total de hemácias, leucócitos e trombócitos.

Os animais tiveram seu sangue puncionado para análise hematológica nos seguintes dias de experimento: primeiro (1°), décimo quinto (15°), trigésimo (30°) e quadragésimo sexto (46°).

O método de escolha para estimativa de concentração de hemoglobina foi o de cianometa-hemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973), sendo amostras de 20 µL de sangue diluídas em 5 ml de reagente de cor da hemoglobina. Após 10 minutos, a amostra foi centrifugada por 15 minutos e o sobrenadante foi lido em maquinário LABQUEST sob a absorbância de 540 nm, sendo a unidade expressa em g dL⁻¹ de hemoglobina.

Para o valor do hematócrito, as amostras sanguíneas homogeneizadas foram introduzidas em capilares para micro-hematócritos, que foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g em centrífuga de micro-hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). A avaliação foi feita com auxílio de micro-hematócrito e expressa como vol. eritrócitos 100cm⁻³.

Foram utilizados 20 µL de sangue homogeneizados para a determinação da concentração de eritrócitos e leucócitos, que foram diluídos e homogeneizados em 4 mL de diluente Natt e Herrick (1952). Em seguida, realizamos a contagem utilizando microscópio óptico de luz, com aumento de 40x. A área de contagem para leucócitos e para hemácias está demonstrada na Figura 5.

Figura 5 - Desenho esquemático da câmara de Neubauer com as áreas predefinidas para a contagem de células sanguíneas.

Posteriormente, ajustamos a contagem de eritrócitos com a seguinte fórmula: n° de eritrócitos $\times 200 \times 10 \times 5$; para leucócitos usamos a seguinte fórmula: n° de leucócitos $\times 200 \times 10 \times 1/4$ (referentes à diluição, altura da câmara de Neubauer e área contada), em número de células μL^{-1} de sangue.

A proteína plasmática total foi determinada por meio do plasma contido no tubo de hematócrito, plasma este que foi aferido em refratômetro portátil, com unidade de medida em g dL^{-1} .

A partir da mensuração do hematócrito, concentração de hemoglobina e hemácias, determinamos o volume corpuscular médio, a hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular média, por meio das seguintes fórmulas:

- Volume Corpuscular Médio: $\text{VCM} = \text{Ht} \times 10/\text{He}$, sua unidade será expressa em fL (fentolitros, equivalente a 10^{-15} litro).
- Hemoglobina Corpuscular Média: $\text{HCM} = \text{Hb} \times 10/\text{He}$, sua unidade será expressa em pg (picogramas, equivalente a 10^{-12} grama).
- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média: $\text{CHCM} = \text{Hb} \times 100/\text{Ht}$, sua unidade será expressa em g/dL (gramas decilitros $^{-1}$).

As contagens diferenciais de leucócitos foram feitas através das extensões de amostras sanguíneas. A coloração usada foi a de May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld (1947): usamos 1 mL do corante e o deixamos agir por 4 minutos. Depois, adicionamos 2 mL de água deionizada sobre a extensão e a deixamos agir por 14 minutos. As lâminas foram lavadas com

água corrente e colocadas para secar em temperatura ambiente. Em seguida, fizemos a leitura em microscopia óptica de luz e avaliamos as seguintes células: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, célula granulocítica especial (CGE), linfócitos e monócitos. Foram contadas cem células em cada lâmina e o resultado foi expresso em porcentagem (%) de cada tipo celular. O resultado foi expresso em números totais, utilizando a porcentagem sobre o número de leucócitos.

Na lâmina de extensão sanguínea, foram contados os trombócitos em 1000 hemácias contadas, segundo a fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de trombócitos} \times \text{He}}{1000}$$

4.6 Ganho de peso e conversão alimentar

Todos os peixes foram pesados nos 1º, 15º, 30º e 45º dias do experimento, em balança de precisão (0,01g), com jejum prévio de 12 horas e sedação das carpas com 50mg L⁻¹ de óleo de cravo. Para a avaliação do desempenho produtivo foi determinado: o ganho de peso (peso final – peso inicial); o consumo da dieta (peso da alimentação oferecida – peso de sobra alimentar); a conversão alimentar (consumo médio de ração num dado período/ganho de peso médio); a eficiência proteica (ganho de peso x100/ consumo x % proteína bruta da dieta); a porcentagem de sobrevivência (animais vivos/animais totais) e o fator de crescimento, cuja fórmula é: [(ln peso final – ln peso inicial)/tempo de experimentação]x100. A conversão alimentar foi calculada pela divisão do ganho de peso médio (g) pelo consumo médio de alimento (g). O fator de condição (K), índice que expressa parcialmente o estado nutricional, foi calculado pela fórmula: $K = \text{peso} \times 100 / \text{comprimento}^3$, baseada na seguinte equação: $W = aL^n$, sendo W= peso em gramas, “a” é uma constante, L é o comprimento em centímetros, e “n” é um expoente que varia entre 2,5 a 4, sendo que o ideal, observado em vários peixes, é de 3 (LE CREN, 1951).

4.7 Desafio Imunológico, Colheita de Amostras e Avaliação Final

No 45º dia de experimento, os animais foram submetidos ao estresse de captura por cinco minutos. Em seguida, foram testados biologicamente, com a inoculação de *Aeromonas hydrophila*, ATCC 7966, via intracelomática, na concentração de 3×10^7 bactérias mL⁻¹, seguindo metodologia de Brenden e Huizinga (1986) e Harikrishnan, Rani e Balasundaram (2003). Estes animais foram acompanhados clinicamente por 24 horas. Após esse período, todos os peixes tiveram amostras sanguíneas coletadas e foram sacrificados.

4.8 Avaliação macroscópica *post mortem*

Todos os animais foram necropsiados e fotografados. Durante a necropsia, quatro animais, sendo um animal de cada grupo, foram randomicamente escolhidos para exames microbiológicos (isolamento do agente). Todos os animais tiveram seus tecidos coletados para posterior exame histopatológico.

4.9 Avaliação histopatológica

Após a necropsia, foram coletados: brânquias; cérebro; vesícula gasosa; fígado; baço; rim (parte cefálica, istmo e caudal); gônadas; intestino; pele; musculatura e coração. Esses órgãos foram fixados em formol 10% tamponado. Após a fixação, foram seccionadas e selecionadas áreas de corte para a avaliação histológica.

O processamento das amostras foi feito segundo metodologia aplicada no laboratório de histopatologia do setor de patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), que consistiu de desidratação progressiva em série de

álcoois, depois, diafanização do tecido com xilol e, por fim, a inclusão da parafina e montagem dos blocos (Quadro 1).

Quadro 1 - Processamento de rotina para exame histológico.

Produto	Tempo
Álcool 95%	1 hora
Álcool 95%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Xilol	1h30min
Xilol	1h30min
Xilol	1h30min
Parafina	1h30min
Parafina	3 horas

Depois que os blocos esfriam e endurecem, eles são aparados e armazenados em geladeira. Antes de cortá-los em micrótomo, eles ficam imersos em água durante 30 minutos. Durante secção, ficam imersos em gelo. Os blocos foram seccionados em micrótomo Leica RM2245, com cortes de espessura de 5 μ m, que foram distendidos em água na temperatura de 40° C, “pescados” com uma lâmina de extremidade fosca. Posteriormente, as lâminas foram para estufa a 56°C “*overnight*” para secagem e remoção de excedentes de parafina.

A coloração escolhida foi a Hematoxilina-Eosina, seguindo o Quadro 2 (método progressivo) para corar, o que consiste em: desparafinização e hidratação, para que os corantes hidrossolúveis possam corar; lavagem; coloração de fundo ou secundária; desidratação e remoção do excesso de corante; impermeabilização e montagem da lâmina com resina e lamínula.

Quadro 2 - Roteiro para coloração pela Hematoxilina e Eosina.

Produto	Tempo
Xilol 1	10 minutos
Xilol 2	10 minutos
Xilol 3	10 minutos
Álcool absoluto	3 minutos
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
Água corrente	3 minutos
Hematoxilina	3 minutos
Água corrente	Excesso
Álcool ácido	Rápido
Água corrente	10 minutos
Eosina	1 minuto
Álcool 95%	Rápido
Álcool absoluto	2 passagens
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool-xilol	2 minutos
Xilol diafanizador	2 minutos

Depois de preparadas as lâminas, foram feitas minuciosas observações em microscópio óptico de luz (Olympus BX40). Em seguida, as amostras foram fotografadas e foi feita a análise das imagens no programa ImageJ 1.4.3.67 (Copyright© 1993-2006, Broken Symmetry Software).

4.10 Análises físicas e químicas da água

Foram avaliadas as temperaturas máximas e mínimas dos tanques diariamente, seguindo o modelo do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). Foram avaliados também pH da água, amônia não-ionizada e oxigênio diluído semanalmente.

4.11 Preparação de inóculo

As amostras de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 foram cedidas pela Faculdade de Saúde Pública da USP. Foram cultivadas em meio LB e misturadas em 0,85% NaCl e 20% glicerol, sendo posteriormente, armazenadas em freezer a -70° C (CHABOT; THUNE, 1991).

No Laboratório de Resistência Bacteriana do Instituto de Biomédicas da USP, a bactéria foi repicada em meios LB e MC. Depois, a concentração bacteriana foi padronizada utilizando tamanho de onda de 625nm, em espectrofotômetro, e posterior verificação em placas de Agar LB com diluições sucessivas, em que obtivemos a concentração de 1×10^7 UFC em 1,24 μ l.

O reisolamento da bactéria, para concluir o postulado de Koch, foi feito por meio de *swab* da cavidade celomática da carpa, que depois foi semeada em meio MC. Após o crescimento, as bactérias foram repicadas em meio MC novamente, mas com tratamento com ceftazidima 30mcg, imipenema 10 mcg e cefoxitina 30 mcg.

4.12 Análises estatísticas

Foram utilizadas duas análises estatísticas principais: uma baseada no conceito de que as amostras estão relacionadas entre si, pois os animais avaliados foram os mesmos, só que em períodos de experimentação diferentes; a outra baseada no conceito de que há dois grupos independentes, um denominado controle e outro denominado imunoestimulado. Foi realizado o teste ANOVA para medidas repetidas, com pós-teste de Tukey e o teste de t de Student, para as amostras dos mesmos animais, ao longo do tempo experimental, e foi utilizado para compara os dois grupos o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's e o teste de Mann Whitney.

5 RESULTADOS

Os animais que foram alimentados com dieta padrão apresentaram um desempenho produtivo menor que o grupo tratado com imunoestimulante, o que está evidenciado pelo gráfico 1, sendo que as populações eram estatisticamente iguais no começo do experimento, e ao analisar o ganho de peso, a população alimentada com MOS teve diferença significativa entre o peso inicial e o peso final ($P < 0,05$); a população controle teve estatisticamente, o mesmo peso inicial e o peso final.

Gráfico 1 – Gráfico representando o peso animal em cada grupo, ao longo do tempo de experimentação. Barras em preto significam carpas suplementadas com MOS; barras em branco: animais com ração controle; eixo y correspondente ao peso em gramas, eixo x, dia da avaliação - São Paulo (SP) - 2011.

Sobre os índices zootécnicos, todos os animais sobreviveram ao período de alimentação: foram alimentados com 43,2 g de alimento por dia (consumo real) e a conversão alimentar do grupo imunoestimulado foi de 6,15, enquanto o grupo controle teve conversão alimentar de 14,09. A taxa de eficiência proteica foi de 0,25 para os animais do grupo controle e 0,57 para os animais tratados com MOS. Os animais controle tiveram uma média de 1,61 de fator de condição

nutricional e os animais imunoestimulados 1,63. O fator de crescimento do grupo controle foi de 0,05 g dia⁻¹ e o suplementado com MOS foi de 0,11 g dia⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação dos índices zootécnicos de carpas com dietas suplementadas com MOS e dieta controle - São Paulo (SP) - 2011

Índices Zootécnicos	Suplementados com MOS	Alimentação Controle
Sobrevivência	100%	100%
Conversão alimentar	6,15	14,09
Taxa de eficiência proteica	0,57	0,25
Crescimento	0,11 g dia ⁻¹	0,05 g dia ⁻¹
Fator de condição	1,63	1,61

Com relação aos parâmetros limnológicos, tivemos média de temperatura de 23,48° C, sendo a temperatura mais alta de 26,9° C, registrada nos dias 10 e 11, e a temperatura mais baixa de 19,7° C, registrada no dia 1° de novembro de 2011. A média de oxigênio dissolvido foi de 7,19 ppm, a de pH foi de 6,8 e a de amônia não ionizada (NH₃) foi de 0,02 ppm.

Na avaliação hematológica não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos e entre o mesmo grupo, utilizando o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey, “t de Student” para amostras dos mesmos animais e o teste de Kuskal-Wallis, com pós-teste de Dunn’s para amostras individuais (grupos diferentes, animais diferentes), com $P < 0,05$. O grupo controle, conforme as coletas teve uma aparente diminuição do hematócrito, enquanto o grupo tratamento teve uma diminuição inicial e ascensão posterior (Tabela 3).

Nas Tabelas 4, 5 e 6, podemos observar que, apesar de haver diferentes resultados obtidos nas coletas, não há diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo tratamento.

Tabela 3 - Avaliação de médias e desvios-padrões (DP) em relação ao hematócrito, à proteína total, ao número total de eritrócitos e de leucócitos do grupo controle e o do grupo tratamento, durante o período experimental - São Paulo (SP) – 2011.

Grupo	Data da avaliação	Hematócrito		Proteína Total		Eritrócitos		Leucócitos	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	29/10/11	40,58	6,1	5,52	0,56	1,45	0,43	23,2	7,7
	12/11/11	34,27	5,9	5,2	0,45	1,56	0,49	28,94	8,03
	26/11/11	36,05	5,38	5,35	0,32	1,13	0,32	32,94	12,64
	10/12/11	33,44	6,22	5,42	0,38	1,36	0,28	25,22	6,13
Tratamento	29/10/11	42,2	6,3	5,39	0,45	1,37	0,88	21,91	10,87
	12/11/11	35,22	6,11	5,35	0,37	1,45	0,36	28,44	11,42
	26/11/11	36,72	4,68	5,35	0,31	0,92	0,32	28,36	10,99
	10/12/11	37,62	9,24	5,4	0,4	1,59	0,51	22,62	10,12
Unidade		%	%	g/dL	g/dL	$\times 10^6/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^3/\mu\text{L}$

Tabela 4 - Avaliação de médias e desvios-padrões (DP) em relação à hemoglobina, ao volume corpuscular médio (VCM), à hemoglobina corpuscular média (HCM) e à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), do grupo controle e o do grupo tratamento, durante o período experimental - São Paulo (SP), 2011.

Grupo	Data da avaliação	Hemoglobina		VCM		HCM		CHCM	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	29/10/11	11,25	3,01	307,57	94,56	83,35	29,43	27,72	5,7
	12/11/11	8,04	2,35	243,01	105,45	53,59	15,43	23,31	6,05
	26/11/11	8,7	1,82	335,61	77,01	81,59	24,38	24,22	4,45
	10/12/11	8,55	1,76	251,16	56,14	64,86	18,44	25,62	3,49
Tratamento	29/10/11	10,09	1,32	405,45	218,79	95,81	46,74	23,91	3,44
	12/11/11	8,5	1,65	254,83	78,18	62,15	21,33	24,24	4,81
	26/11/11	8,9	1,65	450,8	187,63	105,72	34,83	25,11	5,74
	10/12/11	8,98	2,22	165,08	106,13	44,42	34,27	25,35	10,64
Unidade		g/dL	g/dL	fL	fL	pg	pg	g/dL	g/dL

Tabela 5 - Avaliação de médias e desvios-padrões (DP) em relação ao número de trombócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos do grupo controle e do grupo tratamento, durante o período experimental - São Paulo (SP) – 2011.

Grupo	Data da avaliação	Trombócitos		Linfócitos		Neutrófilos		Monócitos	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	29/10/11	18982	9670	18,48	5,73	2,28	2,46	1,02	0,99
	12/11/11	21234	8824	21,14	5,58	2,61	2,24	1,63	1,24
	26/11/11	26067	11221	25,44	10,78	1,6	1,35	1,37	0,73
	10/12/11	29015	18316	21,59	5,81	1,91	2,48	0,95	1,02
Tratamento	29/10/11	20174	21427	16,04	8,09	2,1	2,43	1,61	1,48
	12/11/11	18049	8229	21,48	9,75	2,09	1,76	1,17	0,82
	26/11/11	22150	11541	24,33	9,83	1,18	1,1	1,05	0,89
	10/12/11	24387	26836	16,67	5,75	1,89	1,44	1,28	1,4
Unidade		céls/ μ L	céls/ μ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L

Tabela 6 - Avaliação de médias e desvios-padrões (DP) em relação ao número de células granulocíticas especiais (CGE), eosinófilos e basófilos do grupo controle e do grupo tratamento, durante o período experimental - São Paulo (SP) – 2011.

Grupo	Data da avaliação	CGE		Eosinófilos		Basófilos	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	29/10/11	0,99	1,11	0,38	0,54	0,04	0,14
	12/11/11	1,74	1,74	2,53	1,88	0,07	1,16
	26/11/11	3,2	2,87	1,2	0,76	0,1	0,4
	10/12/11	0,62	0,67	0,12	0,15	0	0
Tratamento	29/10/11	1,78	1,86	0,31	0,42	0,04	0,1
	12/11/11	1,29	1,76	2,36	2,03	0,03	0,11
	26/11/11	0,84	1,05	0,92	1,02	0,01	0,07
	10/12/11	1,78	3,21	2,93	6,22	0,07	0,15
Unidade		$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L	$\times 10^3/\mu$ L

A partir de 10 horas pós-inoculação, os animais começaram a apresentar sinais clínicos como apatia e perda de equilíbrio. Entre 12-24 horas, 88% deles morreram (16 animais de 18). Dos dois sobreviventes, um era do grupo controle e, o outro, do grupo tratamento.

Foram realizados todos os testes hematológicos nos dois animais sobreviventes. Comparando o animal controle com o animal tratado com MOS, observamos que o animal tratado teve um aumento no número de eritrócitos, leucócitos e linfócitos (Tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros biométricos e hematimétricos de duas carpas que sobreviveram à inoculação experimental por *A. hydrophila* durante 24 horas, sendo uma do grupo controle e outra do grupo tratamento - São Paulo (SP) - 2011.

Parâmetros avaliados	Controle	Tratamento	Unidade
Peso	163	151	G
Hematócrito	35	36	%
Proteína Total	5,2	5,2	g/dL
Eritrócitos	0,87	1,76	$\times 10^6/\mu\text{L}$
Leucócitos	27,5	29,5	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Hemoglobina	7,7	8	g/dL
VCM	402,2989	204,5455	fL
HCM	88,50575	45,45455	Pg
CHCM	22	22,22222	g/dL
Trombócitos	13920	21120	céls/ μL
Linfócitos	13,475	23,305	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Neutrófilos	2,2	1,77	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Monócitos	3,575	2,655	$\times 10^3/\mu\text{L}$
CGE	7,975	1,475	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Eosinófilos	0,275	0,295	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Basófilos	0	0	$\times 10^3/\mu\text{L}$

A avaliação macroscópica dos animais revelou que o grupo suplementado com MOS foi constituído de dez carpas macho e oito carpas fêmeas, e o do grupo controle, foram quatro carpas macho e quatorze carpas fêmeas. Em relação às carpas infectadas, foram observadas as seguintes lesões:

- 88% apresentaram de petéquias a púrpuras na região das nadadeiras caudal, peitoral, e anal (Figura 6).

Figura 6 - Carpa apresentando hemorragia cutânea em região de nadadeiras caudal, peitoral, e anal (setas). Barra equivalente a 2 cm - São Paulo (SP) – 2011.

- 22% apresentaram áreas esbranquiçadas na pele, com formato irregular, que circunscreviam o local da inoculação (Figura 7).

Figura 7 - Carpa apresentando área esbranquiçada na pele, com formato irregular, que circunscrevia o local da inoculação de *A. hydrophila* (seta). Barra equivalente a 2 cm - São Paulo (SP) – 2011.

- Todos os animais infectados apresentaram os rins (cranial e caudal), baço e fígado congestos (Figura 9). Um animal tinha uma tênia do gênero *Botriocephalus* em lúmen intestinal (Figura 12).

Figura 8 - Necropsia de carpas. Animais 1, 2 e 3 infectados experimentalmente com *A. hydrophila*. O animal 4 é um animal controle. Barra equivalente a 2cm - São Paulo (SP) – 2011.

Microscopicamente, todos os animais inoculados experimentalmente com *A. hydrophila* tiveram congestão dos órgãos, sendo rim cranial (83%), baço (83%) (Figuras 9 e 10), rim caudal

(72%) e fígado (66%) os mais acometidos (Tabela 8). Os animais que foram inoculados com solução fisiológica não tiveram nenhuma lesão relacionada com *Aeromonas hydrophila*. Apenas um animal teve lesão na brânquia e foi relacionada com um parasita trematódeo, do gênero *Centrocestus* (Figura 11). Comparando os dois grupos de animais infectados, os suplementados com MOS tiveram um processo congestivo mais amplo e que envolveu mais o baço, o fígado e o rim do que os animais controle (Tabela 8).

Tabela 8 - Percentual de lesões observadas na histologia de 18 carpas inoculadas experimentalmente com *A. hydrophila* - São Paulo (SP) – 2011.

Lesão	Órgão	% de animais totais	% de animais-tratado	% de animais-controle
Congestão	Fígado	66	88,88	44,44
	Baço	83	100	66,66
	Rim Cranial	83	77,77	77,77
	Rim Caudal	72	77,77	66,66
	Coração	33	33,33	33,33
	Vesícula gasosa	11	0	22,22
	Intestino	11	11,11	11,11
	Brânquias	11	11,11	11,11
Necrose de coagulação	Intestino	5	11,11	0
Inflamação linfocítica multifocal, moderada	Intestino	5	0	11,11
	Vesícula gasosa	5	0	11,11

Figura 9 – Corte histológico de baço de carpa com congestão. HE - São Paulo (SP) - 2011.

Figura 10 – Corte histológico de baço de carpa com congestão. Ilustração 1: visualização geral do órgão; ilustração 2: detalhamento do pâncreas no interior do baço (seta). HE - São Paulo (SP) – 2011.

Figura 11 – Corte histológico da cartilagem branquial de carpa apresentando parasita do gênero *Centrocestus* sp. (seta). HE - São Paulo (SP) - 2011.

Figura 12 – Corte histológico do intestino de carpa apresentando parasita do gênero *Botriocephalus* sp. (seta). HE - São Paulo (SP) - 2011.

O reisolamento bacteriano foi bem sucedido nos animais inoculados com *A. hydrophila* e negativo nos animais inoculados com solução fisiológica estéril, completando o postulado de Koch.

6 DISCUSSÃO

As carpas do grupo controle tiveram uma taxa de crescimento de $0,05 \text{ g dia}^{-1}$ e conversão alimentar de 14,09, enquanto o grupo imunoestimulado obteve as taxas de $0,11 \text{ g dia}^{-1}$ e 6,15 respectivamente. Quanto mais próximo o valor da taxa de conversão alimentar estiver de 1 considera-se melhor a dieta, significando que para cada grama de alimento ingerida, o animal ganha um grama de peso. Em nossos experimentos, observamos que os animais suplementados com MOS obtiveram um resultado 2,2 vezes melhor, quando observados o ganho de peso por dia e quanto de ração consumida é necessária para aumentar o peso do peixe.

A taxa de eficiência proteica, que avalia quanto de proteína bruta oferecida é convertida em peso para o animal, foi de 0,57 para os animais tratados com MOS, e de 0,25 para os animais controle, significando que os animais suplementados com MOS conseguiram absorver 2,28 vezes mais proteínas que o grupo controle. Em outras palavras, os animais suplementados com 0,3% de MOS absorveram melhor os aminoácidos, que são a base alimentar dos animais aquáticos, ocorrendo, um aumento de peso e um melhor aproveitamento nutricional. Isto se deve ao fato que alguns microorganismos intestinais podem utilizar o MOS como fonte de energia (LESLIE, 1996). Dessa maneira, selecionam-se microorganismos que contribuem para uma melhor absorção de nutrientes para o peixe.

O fator de condição é um índice que indica o grau de bem-estar do peixe frente ao meio em que vive e deve permanecer constante em um determinado período, independente do tamanho do animal (LE CREN, 1951; BRAGA, 1986). Os resultados de 1,63 (grupo imunoestimulado) e 1,61 (grupo controle) afirmam que em ambos os tanques os peixes apresentavam a mesma situação de bem-estar. Comparando-se os resultados aqui obtidos com o trabalho de Rocha et al. (2005), que obteve 1,87, observamos que a principal diferença se apresentou devido ao fato de que, no trabalho de Rocha, os animais eram juvenis (120 dias) e esse fator de imaturidade sexual faz com que o fator de condição tenha um resultado mais elevado do que encontrado em nosso trabalho, onde os animais eram adultos (entre um a dois anos de vida).

Em trabalho similar, realizado por Sousa (2010), as tilápias suplementadas com MOS tiveram um aumento de peso relativamente maior comparado com o grupo controle. Contudo, Ebrahimi et al. (2011) utilizaram quatro dosagens de Immunogen (preparado a base de MOS e β -

glucan), que variaram de 0,5 a 2,5 g Kg⁻¹, durante 56 dias e não observaram diferença de ganho de peso em carpas juvenis. Já Dimitroglou et al. (2010), não obtiveram diferença de crescimento e engorda de dourada (*Sparus aurata*), utilizando MOS a 0,2% e 0,4%, durante 63 dias. Pakravan, Hajimoradloo e Ghorbani (2011) utilizando durante 56 dias *Epilobium hirsutum* como imunoestimulante para carpas, não obtiveram diferença estatisticamente significantes sobre a taxa de crescimento, conversão alimentar e fator de condição. Culjak et al. (2004) relatam que a adição de 0,6% de MOS na dieta de juvenis de carpa melhoram a conversão alimentar, crescimento, ganho de peso e sobrevivência.

Sobre as análises hematológicas, os animais de ambos os grupos não diferiram estatisticamente. O trabalho de Sado, Bicudo e Cyrino (2008) com juvenis de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*); Welker et al. (2007), com bagre do canal (*Ictalurus punctatus*); Tavares-Dias e Morais (2004); Hisano et al. (2007) e Sousa (2010) com tilápia (*O. niloticus*) também não obtiveram diferença entre os valores hematológicos entre o grupo controle e o grupo que recebeu MOS. Ebrahimi et al. (2011) encontraram leucocitose no grupo de carpas juvenis suplementadas, o que foi justificado no trabalho como estresse causado pela administração diária de β -glucan.

Maqsood, Samoon e Singh (2009), verificaram que carpas suplementadas com levamisol tiveram valores de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina significativamente mais elevados do que o grupo controle pós-inoculação de *A. hydrophila*, enquanto a contagem total de leucócitos foi menor nas carpas imunoestimuladas, quando comparada com o grupo controle. Yoo et al. (2007) verificaram que *Paralichthys olivaceus* suplementados com β -1,3 glucan, tiveram maior valor de hematócrito quando comparados com o grupo controle. Anderson e Siwicki (1994) observaram que a proteína total sérica aumenta em peixes com dietas suplementadas com imunoestimulantes. Apesar de não diferir estatisticamente os valores de hematócrito, eritrócitos e hemoglobina do grupo tratado com MOS foram mais elevados quando comparados com o grupo controle, no 46º dia. Os valores da contagem total de leucócitos das carpas suplementadas foram menores do que das carpas controle, mas não diferiram estatisticamente. Os valores de proteína total foram iguais entre os grupos controle e tratamento.

A inoculação experimental de *Aeromonas hydrophila* apresentou como resultado uma mortalidade aguda de 88% dos peixes em menos de 24 horas. Esse resultado foi inesperado, pois a *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 é uma cepa pouco virulenta aos peixes (LEUNG et al.,

1994), e outros trabalhos consultados, que fizeram inoculação de *A. hydrophila* em carpas (*Cyprinus carpio* - SHARIFPOUR, 1997) obtiveram mortalidade de 25% da população entre 12-24 horas. Abasali e Mohamad (2010), trabalhando com a cepa ATCC 49140 (inoculação de 1×10^8 UFC), tiveram taxa de mortalidade a partir de 12 horas e, ao longo de oito dias, o grupo controle teve taxa de sobrevivência de 48,57%, em tilápias. Reque (2005) não obteve sinais clínicos pós-inoculação; contudo Sarder (2001) obteve alta mortalidade após 12 horas de inoculação na concentração de 5×10^6 UFC. A temperatura no dia da inoculação no presente experimento era de 26,9 °C, correspondente à temperatura ótima de crescimento de *A. hydrophila* (SHARIFPOUR, 1997), o que possivelmente propiciou o rápido desenvolvimento da doença.

A *causa mortis* dos animais em nossos experimentos foi por septicemia. Septicemia é definida como uma forma clínica de bacteremia agravada por toxemia, febre, mal-estar e, comumente, choque (MCGAVIN; ZACHARY, 2007; ROBBINS; KUMAR; COTRAN, 2010). Esses autores citam que, independente da causa específica, os elementos mais importantes no choque séptico são: desarranjos hemodinâmicos; temperatura anormal corporal; progressiva hipoperfusão para a microvasculatura; injúria a células sensíveis a hipóxia; ajustes quantitativos de leucócitos e plaquetas; coagulação intravascular disseminada; falha múltipla de órgãos e morte.

Os efeitos, ou a própria existência do choque endotóxico, são muito pouco descritos e estudados em peixes. Acredita-se que, em geral, os peixes são mais resistentes que os mamíferos para o choque endotóxico (ILIEV et al., 2005). Trabalhos realizados com células de truta (estudo *in vitro*) mostraram que os leucócitos são pouco sensíveis para a ativação por LPS. Em macrófagos, o LPS falha em induzir genes antivirais, um evento que ocorre em cascata com o TLR4 (receptor do tipo Toll), e é um requerimento para o desenvolvimento do choque endotóxico.

A *A. hydrophila* está associada à septicemia hemorrágica em peixes e anfíbios (CIPRIANO; BULLOCK; PYLE, 1984), e leva também a uma mortalidade aguda e sem sinais clínicos (SNIESZKO; AXELROD, 1971).

Foram observadas, na contagem de hemácias dos animais infectados, muitas formas cocobacilares bacterianas, associadas a um quadro de congestão de órgãos hematopoiéticos, como o rim cranial (83%), baço (83%), rim caudal (72%), fígado (66%) e hemorragias cutâneas (88%), indicando o diagnóstico de morte por choque endotóxico. Ambos os grupos inoculados

apresentaram o mesmo índice de sobrevivência (11%) e a mesma velocidade de morte (12 horas pós-inoculação). Comparando histologicamente os dois grupos de animais infectados, os peixes suplementados com MOS apresentaram um processo congestivo mais amplo e que envolveu mais o baço, o fígado e o rim do que os animais controle. Macroscopicamente, não houve diferença entre os dois grupos.

A análise hematológica dos animais infectados, quando comparada com os animais que não receberam a inoculação com *A. hydrophila*, nos revelaram que o animal controle infectado apresentou uma anemia macrocítica normocrômica (número de eritrócitos baixo, VCM e HCM altos), trombocitopenia, linfopenia, monocitose e aumento da quantidade das CGE), associando este resultado a um quadro de inflamação aguda (PAES; LEME; CARNEIRO, 2009). O animal infectado tratado com MOS teve seus parâmetros hematológicos próximos aos dos animais não-infectados. Garcia e Morais (2009) observaram, em pacus neutrofilia, monocitose, leucopenia, linfocitopenia e trombocitopenia após a infecção, e Harikrishnan, Rani e Balasundaram (2003) observaram leucocitose e anemia em carpas experimentalmente infectadas. Pakravan, Hajimoradloo e Ghorbani (2011), utilizando a *Epilobium hirsutum*, observaram pós-inoculação de *A. hydrophila* em carpas leucocitose nos animais suplementados com a erva. Antes do desafio, não houve diferença na avaliação hematológica. Abasali e Mohamad (2010) observaram leucocitose em carpas suplementadas com compostos herbais diversos, pós-inoculação experimental de *A. hydrophila*.

Os valores hematológicos das carpas do grupo controle e do grupo imunoestimulado são próximos aos valores encontrados por Tripathi, Latimer e Burnley (2004) e por Tavares-Dias et al. (2004) cujos trabalhos representam os valores de referência para *Cyprinus carpio*.

Segundo o postulado de Koch³ (EVANS, 1976), que associa um agente infeccioso a uma doença clínica, foram realizadas randomicamente amostragens da cavidade celomática de peixes inoculados e não inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Os animais não inoculados com *Aeromonas hydrophila* foram negativos para o crescimento em placas de Agar MC, enquanto os animais inoculados foram positivos e ficaram doentes.

A tênia do gênero *Bothriocephalus* é o gênero que mais acomete carpas. Pode atingir entre 15-23 cm de comprimento e largura de três milímetros. Geralmente são visualizadas em exames *post-mortem* e seu ciclo necessita de crustáceos copépodos (HOLMES; PITHAM, 2004). No

³KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberculose. Mitt. Kaiser. Gesundh. v. 2, p. 1, 1884.

Brasil, foi descrito primeiramente por Pavanelli et al.⁴ apud Rego (1997). A carpa infectada apresentou emagrecimento de 5 gramas, mas não foi observada alteração na necropsia, exame histopatológico e hematológico.

De acordo com Noga (2010), os cistos contendo as metacercárias nas brânquias de peixes, que levam a uma hiperplasia da cartilagem branquial, são um achado patognomônico do trematódeo *Centrocestus* sp. No Brasil, não há relatos desse parasita em peixes, apenas em moluscos, que são seus hospedeiros intermediários, sendo o mais importante no Brasil, o *Melanoides tuberculata* (GIOVANELLI et al., 2002). A carpa parasitada não apresentou alteração de ganho de peso e nem alteração hematológica.

Os resultados hematológicos obtidos neste trabalho poderão ser utilizados como referência para a espécie *Cyprinus carpio*; além de destacar a utilização de MOS como suplemento alimentar. Porém mais estudos são necessários para compreender melhor a participação do MOS como imunestimulante, como por exemplo, avaliação da lisozima sérica; sistema complemento; fagocitose; *burst* oxidativo; globulina sérica e IgM, assim como conhecer melhor a microbiota intestinal, realizar avaliação ultraestrutural das vilosidades intestinais e a avaliação experimental com outros agentes infecciosos.

⁴ PAVANELLI, G.C.; et al. Congresso Brasileiro de Parasitologia, Goiânia, Brazil, p.267, 1995.

7 CONCLUSÃO

- A ração com MOS foi zootecnicamente melhor para a nutrição de carpas e foi considerado então um suplemento viável;
- Não podemos afirmar se houve melhora do sistema imune inato de carpas contra a infecção por *Aeromonas hydrophila* quando suplementados com MOS.

REFERÊNCIAS

- ABASALI, H.; MOHAMAD, S. Immune response of Common Carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 13, p. 1839-1847, 2010.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 499-509, 2003.
- AINSWORTH, A.J. Fish granulocytes: morphology, distribution, and function. **Annual Review of Fish Diseases**, p. 123-148, 1992.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington: American public health association, american water works association, water environmental federation, 1998.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. **Progressive Fish Culturist**, v. 56, n. 4, p. 258-261, 1994.
- APPA. American Pet Products Association. **National pet owner 's survey** . Scarsdale, NY. 2008. Disponível em: <<http://www.americanpetproducts.org>>. Acesso em 13 Maio 2011
- BALLOU, C. E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 5, p. 1197-1200, 1970.
- BALON, E. K. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. **Aquaculture**, v. 129, p. 3-48, 1995.
- BARRETO, L. L., **Estudo sobre o mercado de peixes ornamentais marinhos no Ceará com ênfase na taxa de descarte nas capturas**. 2002. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

BASSLEER, G. The international trade in ornamental fish. In: Eds: KPP Nambiar and T Singh. Aquaculture Towards the 21st Century. **Infofish**. v. 24, p. 1-243, 1995.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, v. 5, p. 771-781, 1973.

BRAGA, F. M. S. Estudo entre fator de condição e relação peso-comprimento para alguns peixes marinhos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 46, n. 2, p. 339-346, 1986.

BRENDEN, S. A.; HUIZINGA, H. W. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* (L.). **Journal of Fish Disease**, v. 9, p. 163-167, 1986.

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

CATTON, W. T. Blood cell formation in certain teleost fishes. **Blood**, v. 6, p. 39-60, 1951.

CHABOT, D. J.; THUNE, R. L. Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinnesque). **Journal of Fish Disease**, v. 14, p. 171-183, 1991.

CHADZINSKA, M.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; PLYTYCZ, B.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L. In vivo kinetics of cytokine expression during peritonitis in carp: Evidence for innate and alternative macrophage polarization. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, p. 509-518, 2008.

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

CIPRIANO R. C.; BULLOCK, G. L.; PYLE, S. W. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **US Fish & Wildlife Service**, 1984.

CULJAK, V.; BOGUT, I.; HAS-CHÖN, E.; MILAKOVIC', Z.; CANECKI, K. Influence of mananoligosaccharides supplementation on juvenile carp (*Cyprinus carpio*) in cage farming. **Krmiva**, v. 46, n. 1, p. 25-29, 2004.

DALMO, R. A.; SELJELID, R. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulfated laminaran (beta(1,3)-D-glucan) on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. **Journal of Fish Disease**, v. 18, p. 175–185, 1995.

DAWES, J. **International experiences in ornamental marine species management**. Part I: Perspectives. Artigo apresentado no workshop: Management strategies for the Marine Ornate Species of the Gulf of California, La Paz, Baja California Sur, Mexico, 18-19 November 1998. Disponível em: <<http://ornamental-fish-int.org/>>, acesso em: 15 abr. 2010. 1998a

DAWES, J. **International experiences in ornamental marine species management**. Part II: Some resource management strategies. Artigo apresentado no workshop: Management strategies for the Marine Ornate Species of the Gulf of California, La Paz, Baja California Sur, Mexico, 18-19 November 1998. Disponível em: <<http://ornamental-fish-int.org/>>, acesso em: 15 abr. 2010. 1998b.

DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D. L.; SPRING, P.; SWEETMAN, J.; MOATE, R.; DAVIES, S.J. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 300, p. 182–188, 2010.

EBRAHIMI, G.; OURAJI, H.; KHALESİ, M. K.; SUDAGAR, M.; BARARI, A.; DANGESARAKI, M. Z.; JANIKHALILI, K. H. Effects of a prebiotic, Immunogen®, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0396.2011.01182.x/full>>, acesso em: 28 jan. 2012.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 827–839, 2001.

EVANS, A. S. Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 49, p. 175-195, 1976.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Córdoba, Argentina: FAO; WHO, 2001. 34p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The numbers represent the average unit value of imports for 1994-2003**. FAO Yearbooks 1996 to 2005, Fishery Statistics, Commodities. Roma, Italy: FAO, 1996-2005, v. 83-87.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, Italy: FAO; WHO, 2010.

FISCHER, U.; UTKE, K.; SOMAMOTO, T.; KOLLNER, B.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T. Cytotoxic activities of fish leucocytes. **Fish Shellfish Immunology**, v. 20, p. 209–226, 2006.

FLEMMING, J. S. **Utilização de levedura, probiótico e mananoligossacarídeo (MOS) na alimentação de frangos de corte**. 2005. 92 f. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FRAIRE, A. E. *Aeromonas hydrophila* infection. **Journal of the American Medical Association**, v. 239, p. 192, 1978.

GARCIA, F.; MORAES F. R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 17-21, 2009.

GIOVANELLI, A.; VIEIRA, M. V.; SILVA, C. L. P. A. C. Interaction between the intermediate host of schistosomiasis in Brazil *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) and a possible competitor *Melanoides tuberculata* (Thiaridae): I. Laboratory Experiments. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 363-369, 2002.

GISMONDO, M. R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 12, p. 287-292, 1999.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GOMEZ, G. D.; BALCAZAR, J. L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v. 52, p. 145–154, 2008.

GRIZZLE J. M.; KIRYU Y. Histopathology of gill, liver, and pancreas, and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. **Journal of Aquatic Animal Health**. v. 5, p. 36-50, 1993.

HANSEN, J. D.; LANDIS, E. D.; PHILLIPS, R. B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **Proceedings of the National. Academy of Sciences**. v. 102, p. 6919–6924, 2005.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C. In vitro and in vivo studies of the use of some medicinal herbals against the pathogen *Aeromonas hydrophila* in goldfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.20, p. 165-176, 2008.

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

HISANO, H.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): Aspectos hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 1, p. 35–42, 2007.

HOFACRE, C. L.; BEACORN, T.; COLLETT, S.; MATHIS, G. Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, p. 60–64, 2003.

HOLMES, K.; PITHAM, T. **Manual of koi health**. Canada: Firefly book, 2004. 160p.

HUISING, M. O.; GEVEN, E. J. W.; KRUISWIJK, C. P.; NABUURS, S. B.; STOLTE, E. H.; SPANINGS, F. A. T.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L.; FLIK, G. Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. **Endocrinology**, v. 147, p. 5786–5797, 2006.

IBAMA. **Controle de registros de exportação de peixes ornamentais de águas continentais, estatística por espécie**. 2007a. Disponível em http://www.ibama.gov.br/category/40?download=1382%3A_-p-2007_-p Acesso em: 05 out. 2011.

IBAMA. **Controle de registros de exportação de peixes ornamentais de águas continentais, estatística de valores de exportação por estado.** 2007. Disponível em http://www.ibama.gov.br/category/40?download=1494%3A_-p-_2006_-.p Acesso em: 05 out. 2011.

IBAMA. **Controle de registros de exportação de peixes ornamentais marinhos, estatística de valores de exportação por estado.** 2007c. Disponível em http://www.ibama.gov.br/category/40?download=1502%3A_-p-_2007_-.p Acesso em: 05 out. 2011.

IBAMA. **Controle de registros de exportação de peixes ornamentais de águas continentais, estatística de valores de exportação por estado.** 2006. Disponível em http://www.ibama.gov.br/category/40?download=1494%3A_-p-_2006_-.p Acesso em: 05 out. 2011.

IBAMA. **Projeto peixes ornamentais marinhos: ordenamento da captura e comercialização. relatório final**, Tamandaré PE: IBAMA, 2000.

ILIEV, D. B.; ROACH, J. C.; MACKENZIE, S.; PLANAS, J. V.; GOETZ, F. W. Endotoxin recognition: In fish or not in fish?. **FEBS Letters**, v. 579, n. 29, p. 6519–6528, 2005.

KARUNASAGAR, I.; ROSALIND, G.; KARUNASAGAR, J. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. **Journal of Fish Disease**, v. 14, p. 413–417, 1991.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; GUZMÁN-MÉNDEZ, B. E.; LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, p. 193–201, 2002.

LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, p. 201-219, 1951.

LESLIE, A. J. **The ever-increasing role of biotechnology in the poultry industry**: lessons from the past and thoughts for the future. In: NORTH AMERICAN UNIVERSITY TOUR, 1996, Nicholasville. **Proceedings**. Nicholasville: Alltech, 1996. 65-85 p.

LEUNG, K. Y.; STEVENSON, R. M. W. Characteristics and Distribution of Extracellular Proteases from *Aeromonas hydrophila*. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 151-160, 1988.

LEUNG, K. Y.; YEAP, I. V.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. Serum resistance as good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. **Journal of Fish Disease**, v. 18, p. 511-518, 1994.

LILLEHAUG, A. Oral immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis with vaccines protected against digestive degradation. **Journal of Fish Disease**, v. 12, p. 579–584, 1989.

LILLEY, J. H., CALLINAN, R. B., KHAN, M. H. Social, economic and biodiversity impacts of epizootic ulcerative syndrome (EUS). In: ARTHUR, J. R., PHILLIPS, M. J., SUBASINGHE, R. P., REANTASO M. B., MACRAE, I. H. **Primary aquatic animal health care in rural, small-scale, aquaculture development**. Rome, Italy. FAO Fisheries Technical Paper. n. 406. 2002. 382p. (Fisheries Technical Paper. n. 406).

LIVENGOOD, E. J.; CHAPMAN, F. A. **The ornamental fish trade: an introduction with perspectives for responsible aquarium fish ownership department of fisheries and aquatic sciences**. Florida: Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2007.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137–151, 2006.

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**, v. 9, p. 111-120, 2009.

MAREL, M.; CASPARI, N.; NEUHAUS, H.; MEYER, W.; ENSS, M. L.; STEINHAGEN, D. Changes in skin mucus of common carp, *Cyprinus carpio* L., after exposure to water with a high bacterial load. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, p. 431–439, 2010.

MAZON, A. F.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L.; FLIK, G.; HUISING, M. O. Corticotropin-releasing hormone-receptor 1 (CRH-R1) and CRH-binding protein (CRH-BP) are expressed in the gills and skin of common carp *Cyprinus carpio* L. and respond to acute stress and infection. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 510–517, 2006.

MCCUNE, A. R. Biogeographic and stratigraphic evidence for rapid speciation in semionotid fishes. **Paleobiology**, v. 22, n. 1, p 34-48, 1996.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY J. F. **Pathologic basis of veterinary diseases**. 4. ed. Saint Louis: Mosby Elsevier. 2007. 1476 p.

MEIRELLES, M. E. **Viabilidade do cultivo do neon gobi, *Elacatinus figaro***. 2008. 46 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

MILES, R. D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: Natural ways to prevent colonization by pathogens. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY OF ANNUAL SYMPOSIUM, 9., 1993, London. **Proceedings...** London: Nottingham University Press, 1993. p. 133-150.

MITTAL, K. R.; LALONDE, G.; LEBLANC, D.; OLIVIER, G.; LALLIER, R. *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surface characteristics. **Canadian Journal of Microbiology**, v.26, p. 1501-1503, 1980.

MIYAZAKI, T.; JO, Y. A Histopathological Study of Motile Aeromonad Disease in Ayu. **Fish Pathology**, v. 20, n. 1, p. 55-59, 1985.

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

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, p. 735-738, 1952.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, p. 2-14, 2010.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 4. ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2006. 601 p.

NOGA, E. J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. 2. ed. Yowa, USA: Wiley-Blackwell, 2010. 519 p.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, p. 41-50, 2002.

OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; FRANCESCHI, C. Evidence for the presence of immunoreactive POMC-derived peptides and cytokines in the thymus of the goldfish (*Carassius auratus*). **Histochemical Journal**, v. 27, p. 597–601, 1995.

PAES, P. R. O.; LEME, F. O. P.; CARNEIRO, R. A. **Hematologia dos animais domésticos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, FEPMVZ, 2009. 119 p.

PAKRAVAN, S.; HAJIMORADLOO, A.; GHORBANI, R. Effect of dietary willow herb, *Epilobium hirsutum* extract on growth performance, body composition, haematological parameters an *Aeromonas hydrophila* challenge on common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture Research**, p. 1-9, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2011.02901.x/full>>. Acesso em: 29 jan. 2011.

PALAKSHA, K. J.; SHIN, G. W.; KIM, Y. R.; JUNG, T. S. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 24, p. 479–488, 2008.

PALMEIRO, B.; ROBERTS, H. Bacterial disease in fish. In: ROBERTS, H. E. **Fundamentals of ornamental fish health**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 229 p.

PEDERSEN, G. M.; GILDBERG, A.; OLSEN, R. L. Effects of including cationic proteins from cod milt in the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. **Aquaculture**, v. 233, p. 31–43, 2004.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M., HEISER, J. B. **Vertebrate Life**. 6.ed. San Francisco: Pearson Education. 2006. 684 p.

RAA, J.; ROERSTAD, G.; INGESTED, R.; ROBERTSON, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, I. M.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R. (Ed.). **Diseases in Asian aquaculture**: I. Fish health section. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society. 1992. 39–50 p.

RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Review in Fisheries Science**, v. 4, p. 229–288, 1996.

RADMAN, R.; SAEZ, T.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 91–102, 2003.

REGO, A. A. *Senga sp.*, Ocurrence of a Pseudophyllid Cestode in a Brazilian Freshwater Fish. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 607, 1997.

REITE, O. B.; EVENSEN, Ø. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 192–208, 2006.

REQUE, V. R. **Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. 63 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2005.

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

RINGØ, E.; OLSEN, R.; GIFSTAD, T.; DALMO, R.; AMLUND, H.; HEMRE, G. I.; BAKKE, A. Prebiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v.16, p.117–136, 2010.

ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; COTRAN, R.S. **Pathologic basis of disease**. 8. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010. 1525 p.

ROBERFROID, M. B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructooligosaccharides. **Nutrition Review**, v.54, p.S38-S42, 1996.

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

ROCHA, M. A.; RIBEIRO, E. L. A.; MIZUBUTI, I. Y.; SILVA, L. D. F.; BOROSKY, J. C.; RUBIN, K. C. P. Uso do fator de condição alométrico e de fulton na comparação de carpa (*Cyprinus carpio*), considerando os sexos e idade. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 429-434, 2005.

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

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 20, p. 329-334, 1947.

RUMSEY, G. L.; HUGHES, S. G.; KINSELLA, J. E. Use of dietary yeast *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen by lake trout. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 21, p. 205-209, 1990.

SADO, R. Y. **Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2008. 136 f. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, 2008.

SADO, R. Y.; MATUSHIMA, E. R. Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e ultraestrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus spp.*) ao BCG. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 58-64, 2007.

SADO, R. Y. **Filogenia do processo inflamatório em animais ectotérmicos: estudo comparativo entre peixes teleósteos primitivos e modernos inoculados com BCG**. 2004. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

SAKATA, T.; OKABAYASHI, J.; KAKIMOTO, D. Variations in the intestinal microflora of tilapia reared in fresh and sea water. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 46, p. 313-317, 1980.

SALTON, R.; SCHNICK, S. *Aeromonas hydrophila* peritonitis. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 57, p. 489-491, 1973.

SARDER, M. R. I.; THOMPSON, K. D.; PENMAN, D. J.; MCANDREW, B. J. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 37-46, 2001.

SAVAN, R.; AMAN, A.; NAKAO, M.; WATANUKI, H.; SAKAI, M. Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Immunogenetics**, v. 57, p. 458-463, 2005.

SCHROERS, V.; MAREL, M.; NEUHAUS, H.; STEINHAGEN, D. Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 288, p. 184-189, 2009.

SHARIFPOUR, I. **Histology of the inflammatory response of carp (*Cyprinus carpio* L.) to various stimuli**. 1997. 377 f. Tese (Doutorado em Filosofia) – University of Stirling, Scotland. 1997.

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

SNIESZKO, S. F.; AXELROD, I. I. R. **Diseases of fishes. Book 2A: Bacterial diseases of fishes**. New Jersey, USA: T. F. H. Publications. 1971. 151 p.

SOUSA, A. D. L. **Mananoligossacarídeo e β -glucano na suplementação dietária para juvenis de tilápia-do-nilo mantidos em tanques-rede**. 2010. 42 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2010.

STAYKOV, Y. The influence of Bio-Mos on growth rate and immune status of common carp (*Cyprinus carpio*). In: ALLTECH'S SECOND ANNUAL AQUACULTURE MEETING DUNBOYNE, 2004, Irlanda, 2004.

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S. **Influence of dietary Bio-Mos on growth, survival and immune status of rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus* G.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.)**. Bulgaria: Trakia University, 2006.

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, E. S.; SWEETMAN, E. J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 15, p. 153–61, 2007.

STOSIK, M.; DEPTUŁA, W.; TRÁVNÍČEK, M.; BALDY-C HUDZIK, K. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carps (*Cyprinus carpio*). **Veterinární Medicína**, v. 47, n. 1, p. 21–25, 2002.

SVOBODOVÁ, Z.; KROUPOVÁ, H.; MODRÁ, H.; FLAJŠHANS, M.; RANDÁK, T.; SAVINA, L. V.; GELA, D. Haematological profile of common carp spawners of various breeds. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, p. 55–59, 2008.

SZILAGYI, A. Lactose - a potential prebiotic. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 1591–1602, 2002.

TAVARES-DIAS; M.; BOZZO, F. R.; SANDRIM, E. F. S.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F. R. Células sangüíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 73-80, 2004.

TAVARES- DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: M., TAVARES- DIAS, 2004. 144p.

TAVARES-DIAS; M.; SANDRIM, E. F. S.; CAMPOS-FILHO, E. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 1, p. 175-184, 1999.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER; W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 107–138, 2002.

THONEY, D. A.; LOISELLE, P.V.; SCHLAGER, N. Fishes I. In: Grzimek's animal life ENCYCLOPEDIA. New York: 2.ed. Gale Group Inc., 2003. v. 4, p. 1-455.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology, an introduction**. Saint Louis: 8.ed. Saunders Elsevier, 2009. 574 p.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M. S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 969–981, 2007.

TRIPATHI, N. K.; LATIMER, K. S.; BURNLEY, V. V. Hematological reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, p. 74-83, 2004.

VAN MUISWINKEL, W. B. The piscine immune system: innate and acquired immunity. In: WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish Disease and Disorders**. Cambridge, UK: CAB International, 1995.

VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V.; GROCH, L.; NEPEJCHALOVA, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinárni Medicína**, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005.

WABNITZ, C. T.; TAYLOR, M.; GREEN, E.; RAZAK, T. **From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species**. Cambridge, UK: United Nations Environmental Program - World Conservation Monitoring Centre , 2003. p. 66.

WALENCIK, J.; WITESKA, M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, pt. C, p. 331–335, 2007.

WANG, R.; BELOSEVIC, M. The in vitro effects of estradiol and cortisol on the function of a long term goldfish macrophage cell line. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 327–336, 1995.

WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus* , fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 24–35, 2007.

WHITE, L. A.; NEWMAN, M. C.; CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M. D. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2619–2628, 2002.

WHITTINGTON, M.; PEREIRA, M. A. M.; GONÇALVES, M.; COSTA, A. **Relatório para a Unidade de Gestão Costeira**. Maputo: MICOA, 2000.

WINFREE, R. A. Tropical fish: Their production and marketing in the United States. **World Aquaculture**, v. 20, p. 24–30, 1989.

XIANG, L.; PENG, B.; DONG, W.; YANG, Z.; SHAO, J. Lipopolysaccharide induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes, a possible role in pathogenesis of bacterial infection in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 992–1001, 2008.

YADA, T. Growth hormone and fish immune system. **General and Comparative Endocrinology**, v. 152, p. 353–358, 2007.

YOO, G.; LEE, S.; KIM, C.Y.; OKOREI, E.O. Effect of dietary β -1.3 glucan and feed stimulants in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Journal of World Aquaculture Society**, v.38, n. 1, p. 138–145, 2007.