



**Universidade Federal do Amapá**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical**  
**Mestrado e Doutorado**  
**UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil**



**MÁRCIA KELLY REIS DIAS**

**Efeitos de imunostimulantes no desempenho, fisiologia e imunidade de  
alevinos de *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae)**

**Macapá, AP**

**2019**

**MÁRCIA KELLY REIS DIAS**

**Efeitos de imunoestimulantes no desempenho, fisiologia e imunidade de alevinos de *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae)**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito para à obtenção do título de Doutor em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Dr. Marcos Tavares Dias

**Macapá, AP**

**2019**

*A verdadeira coragem  
é ir atrás de seus sonhos,  
mesmo quando todos dizem  
que ele é impossível!*

*Cora Coralina*

## **Agradecimentos**

- ❖ A Deus por me manter sempre forte e determinada na concretização dos meus objetivos.
- ❖ Ao meu orientador, Dr. Marcos Tavares Dias, pela dedicação, grande paciência, amizade e ensinamentos durante esses 10 anos de orientação e no desenvolvimento deste trabalho.
- ❖ A minha família que mesmo não sabendo a importância do trabalho sempre tentaram ajudar de alguma forma.
- ❖ A pesquisadora Eliane Tie Oba Yoshioka e colegas de laboratório de Nutrição Renata das Graças Marinho, Maria Danielle Hoshino, Singelfrann Soares e Daniel Pandilha, pela aprendizagem e auxílio nos procedimentos de coleta durante os experimentos.
- ❖ Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Sanidade e de Nutrição da Embrapa Amapá: Lígia Rigôr, William Felix, Marcos Sidney Oliveira pelas suas contribuições nas coletas e pelo apoio durante o projeto.
- ❖ A Embrapa Amapá, por ceder o espaço, laboratórios e equipamentos para realização do trabalho.
- ❖ Ao CAPES, pelo suporte financeiro concedido para a execução do projeto e pela bolsa de Doutorado que me foi concedida.
- ❖ A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

**MARCIA KELLY REIS DIAS**

**Efeitos de imunoestimulantes no desempenho, fisiologia e imunidade de alevinos de  
*Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae)**

---

Dr. Marcos Tavares Dias (Orientador)  
Embrapa Amapá/ PPGBIO

---

Dr. Alexandro Cezar Florentino  
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) / PPGBIO

---

Dra. Marcela Nunes Videira  
Universidade do Estado do Amapá/ (UEAP)

---

Dra. Silvia Maria Mathes Faustino  
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) /PPGCS

---

Dr. Luis Mauricio Abdon da Silva  
Instituto de Pesquisas Cientificas e Tecnologicas do Amapá (IEPA)

Aprovada em: 29 de janeiro de 2019, Macapá, AP, Brasil.

## PREFÁCIO

Esta tese está dividida em introdução geral e quatro artigos, seguindo o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO). As normas propostas pelo PPGBio vão até as referências da introdução geral, pois os artigos seguem as normas dos periódicos de submissão. O artigo 1 intitulado “**Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon**”, publicado no periódico *Veterinary Microbiology* em 2016 (Qualis B1). O artigo 2 intitulado “**Growth, physiological and immune responses of *Arapaima gigas* (Arapaimidae), fed diets supplemented with an immunostimulant additive following *Aeromonas hydrophila* and handling stress**”, foi publicado no periódico *Fish and Shellfish Immunology* em 2019 (Qualis A2). O artigo 3 intitulado “**Feed supplementation with commercial immunostimulant affect the growth performance, physiology and immunity of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) subjected to handling stress**”, segue as as normas do periódico *Aquaculture* (Qualis A1), para o qual foi submetido. O artigo 4 “***Mansoa alliacea* extract improve growth performance and innate immunity of *Arapaima gigas* challenged with *Aeromonas hydrophila* and stress of handling**”, segue as normas do periódico *Fish and Shellfish Immunology* (Qualis A2), para o qual será submetido.

## RESUMO

**Dias, Márcia Kelly Reis. Uso de imunostimulantes no desempenho, fisiologia e imunidade de alevinos de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Arapaimidae). Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBio), Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2019.**

Este estudo investigou os efeitos da suplementação na dieta, durante 30 dias, com os imunostimulantes comerciais AquateFish<sup>®</sup> e Levabom<sup>®</sup>, ambos base de *Saccharomyces cerevisiae*; além de extrato de *Mansoa alliacea* (cipó-alho) no desempenho zootécnico, hematologia e imunologia de *Arapaima gigas* desafiados com estresse de manejo e inoculação com *Aeromonas hydrophilla*. Inicialmente, foi determinado a tolerância de *A. hydrophilla* para *A. gigas* e os sinais clínicos, após inoculação intradérmica dessa bactéria. A concentração letal (CL<sub>50-96h</sub>) para *A. hydrophilla* foi  $1,8 \times 10^8$  UFC/mL; e os sinais clínicos observados foram: despigmentação do tegumento, lesões na nadadeira caudal, perda de equilíbrio, redução dos movimentos respiratórios, focos hemorrágicos no tegumento, hemorragias necróticas nos órgãos internos entre outros sinais. A suplementação na dieta com 0, 6, 9 e 12 g/kg de AquateFish<sup>®</sup> não influenciou no desempenho zootécnico, mas aumentou o número de eritrócitos, trombócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos, hemoglobina, glicose, globulinas e triglicerídeos plasmáticos dos peixes que receberam 12 g de AquateFish<sup>®</sup>/kg. Após estresse e inoculação intraperitoneal com *A. hydrophilla*, a explosão respiratória de leucócitos, número de leucócitos e linfócitos aumentaram nos peixes que receberam suplementação com 12 g de AquateFish<sup>®</sup>/kg de dieta. Em peixes suplementados com 0, 4, 6 e 8 g/kg de Levabom<sup>®</sup>, houve uma melhora no desempenho zootécnico com adição de 6 e 8 g/kg na dieta. Nos peixes suplementados com 8 g/kg de Levabom<sup>®</sup> houve diminuição nos níveis de glicose e colesterol, e aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média e na explosão respiratória de leucócitos, mas uma diminuição do número monócitos e linfócitos. Após o desafio de estresse de manejo ocorreu aumento dos níveis de glicose e diminuição dos níveis de colesterol, globulina e volume corpuscular médio nos peixes suplementados com 4 e 8 g/kg de Levabom<sup>®</sup>. Em peixes suplementados com 0, 4, 8 e 12 g/kg de extrato de *M. alliacea* houve uma melhora no desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos e bioquímicos somente com 8 e 12 g/kg na dieta. Em peixes suplementados com 8 g/kg de *M. alliacea* ocorreu aumento nos níveis de glicose, globulinas e albumina, enquanto nos peixes suplementados com 8 e 12 g/kg houve um aumento na explosão respiratória de leucócitos. Assim, nós recomendamos o uso de 12 g/kg de

AquateFish® ou 8 g/kg de extrato de *M. alliacea* ou de Levabom® na dieta para alevinos de *A. gigas*, para melhoria do crescimento e imunidade inata dos peixes.

**Palavras-chaves:** imunoestimulante; peixe de água doce; pirarucu; *Mansoa alliacea*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Aeromonas hydrophilla*.

## ABSTRACT

**Dias, Márcia Kelly Reis. Use of immunostimulants on the performance, physiology and immunity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) fingerlings (Arapaimidae). Thesis (Doctorate in Tropical Biodiversity). Program of Post-Graduation in Tropical Biodiversity, Federal University of Amapá, Macapá, 2019.**

This study investigated the effects of dietary supplementation for 30 days with the commercial immunostimulants AquateFish® and Levabom®, both based on *Saccharomyces cerevisiae*; in addition to *Mansoa alliacea* extract in the growth performance, hematology and immunology of *Arapaima gigas* challenged with handling stress and inoculation with *Aeromonas hydrophilla*. Initially, the tolerance of *A. hydrophilla* to *A. gigas* and clinical signs was determined after intradermal inoculation of this bacterium. The lethal concentration (LC<sub>50-96h</sub>) for *A. hydrophilla* was  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL; and the clinical signs observed were: depigmentation of the tegument, lesions in the caudal fin, loss of balance, reduction of respiratory movements, haemorrhagic foci in the tegument, necrotic hemorrhages in the internal organs among other signs. Dietary supplementation with 0, 6, 9 and 12 g/kg of AquateFish® did not influence growth performance, but increased the number of total erythrocytes, thrombocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, hemoglobin, glucose, globulins and plasma triglycerides of fish received 12 g of AquateFish®/kg. After stress and intraperitoneal inoculation with *A. hydrophilla*, the respiratory burst of leukocytes, number of leukocytes and lymphocytes increased in fish supplemented with 12 g AquateFish®/kg of diet. In fish supplemented with 0, 4, 6 and 8 g/kg of Levabom®, an improvement in growth performance with addition of 6 and 8 g/kg in the diet was observed. In fish supplemented with 8 g/kg of Levabom® a decrease in glucose and cholesterol levels, and an increase in mean corpuscular hemoglobin concentration and respiratory burst of leukocytes, but a decrease in numbers of monocytes and lymphocytes was observed. After the challenge with handling stress an increase in glucose levels and a decrease in levels of cholesterol, globulin and mean corpuscular volume in fish supplemented



with Levabom<sup>®</sup> 4 and 8 g/ kg. In fish supplemented with 0, 4, 8 and 12 g/kg of *M. alliacea* extract there was an improvement in zootechnical performance, hematological and biochemical parameters with only 8 and 12 g/kg in the diet was found. In fish supplemented with 8 g/kg *M. alliacea* extract an increase in glucose, globulin and albumin levels was observed, while in fish supplemented with 8 and 12 g/kg there was an increase in the respiratory burst of leukocytes. Thus, we recommended the use of 12 g/kg of AquateFish<sup>®</sup> or 8 g/kg of extract of *M. alliacea* or Levabom<sup>®</sup> in the diet for *A. gigas* fingerlings for enhancement of growth and innate immunity of fish.

**Keywords:** immunostimulants; freshwater fish; pirarucu; *Mansoa alliacea*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Aeromonas hydrophilla*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.</b>	<b>O pirarucu <i>Arapaimas gigas</i></b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.</b>	<b><i>Aeromonas hydrophila</i> e ambiente de cultivo</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3.</b>	<b>O sangue e sistema imunológico dos peixes</b> .....	<b>10</b>
1.3.1.	Células e proteínas do sistema imunológico de peixes.....	14
1.3.2.	Atividade respiratória de leucócitos em peixes .....	17
<b>1.4.</b>	<b>Uso de imunostimulantes no desempenho de crescimento e imunidade de peixes</b> ..	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>PROBLEMAS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO</b> .....	<b>32</b>
	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>48</b>
	<b>Lethal dose and clinical signs of <i>Aeromonas hydrophila</i> in <i>Arapaima gigas</i> (Arapaimidae), the giant fish from Amazon</b> .....	<b>48</b>
	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>53</b>
	<b>Growth, physiological and immune responses of <i>Arapaima gigas</i> (Arapaimidae), fed diets supplemented with an immunostimulant additive following <i>Aeromonas hydrophila</i> and handling stress</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>59</b>
	<b>Feed supplementation with commercial immunostimulant affect the growth performance, physiology and immunity of <i>Arapaima gigas</i> (Arapaimidae) subjected to handling stress.</b>	
	<b>59</b>	
	<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>77</b>
	<b><i>Mansoa alliacea</i> extract improve growth performance and innate immunity of <i>Arapaima gigas</i> challenged with <i>Aeromonas hydrophila</i> and stress of handling</b> .....	<b>77</b>
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção de organismos aquáticos em cultivo (aquicultura) refere-se a criação de plantas que tenham um habitat predominantemente aquático e animais que tenham pelo menos uma fase de sua vida na água. O consumo per-capita global de pescado atingiu o recorde de 20,2 kg em 2015 e 20,3 em 2016, devido ao grande crescimento da aquicultura, que atualmente fornece metade do pescado para consumo do homem. Em 2016, a produção mundial de peixes oriundo da aquicultura foi de 80 milhões toneladas e o Brasil ocupou a 13ª posição no ranque mundial (FAO 2018), como uma produção em 485,25 mil toneladas (IBGE 2018).

No Brasil, a aquicultura é a atividade agropecuária que mais tem crescido. Além disso, é uma importante alternativa para abastecimento de pescados para o mercado consumidor, a aquicultura pode reduzir a pressão sobre os estoques pesqueiros naturais de espécies sobreexploradas (Imbiriba 2001, Santos e Santos 2005, Soares et al. 2008, Oliveira et al. 2012), tais como tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Santos e Santos 2005, Soares et al. 2008) e pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Imbiriba et al. 2001, Sebrae 2010). A pesca do pirarucu na bacia amazônica foi realizada de forma indiscriminada durante muito tempo, provocando acentuado declínio nos estoques a ponto de ser considerada uma espécie ameaçada em algumas regiões da Amazônia, e sobreexplorada em outras regiões (Imbiriba et al. 2001, Sebrae 2010). Porém, atualmente, com o defeso as populações ameaçadas estão se recuperando.

A aquicultura continental e marinha contribuem com cerca de 44% da produção total de pescados. Porém, a piscicultura é a atividade que mais vem crescendo no Brasil, com destaque para o cultivo de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* Lineaus 1758, com 110.072 unidades produtoras distribuídas por todos os estados do país, com exceção do estado Amazonas, pois trata-se de um peixe africano introduzido no país em 1971. Entre os peixes nativos, o destaque é para as espécies de peixes redondos, principalmente o tambaqui que tem sido cultivado em 44.978 unidades produtivas em todo território nacional, concentrada principalmente na região Norte do Brasil (42%). Outro peixe que vem ganhando destaque na piscicultura nacional é o pirarucu, encontrado em cerca de 3.246 unidades produtivas distribuídas em todas as regiões do Brasil; porém, sua produção ainda pequena, devido a diversos entraves (MPA 2013, IBGE 2018), principalmente a falta de alevinos e a ocorrência doenças nessa primeira fase do cultivo (Lima et al. 2017).

A intensificação da produção de pirarucu é uma das maneiras de aumentar a sua eficiência produtiva. Porém, com a intensificação na piscicultura intensiva pode haver o aumento da ocorrência de doenças, quando há deterioração da qualidade de água, aumento da

densidade de estocagem e aumento de outras condições que causam estresse nos peixes (Delgado et al. 2007, Adel et al. 2015). Durante a alevinagem do pirarucu, doenças são fatores que podem ocasionar grandes perdas econômicas na produção (Araujo et al. 2009 a,b, Marinho et al. 2013), influenciando negativamente a alimentação, taxa de crescimento, condições corporais e qualidade dos peixes, conseqüentemente interferindo na produção e produtividade (Delgado et al. 2011, Marinho et al. 2013). Assim, é necessário incrementar as condições de saúde do pirarucu durante essa fase inicial do cultivo (alevinagem), não apenas em relação as melhorias nas condições ambientais, mas também quanto ao manejo alimentar e nutricional, aumentando a sua imunidade, visando então uma maior produção e produtividade.

A adição de produtos imunoestimulantes na dieta dos peixes cultivados, para que auxiliem no desempenho zootécnico e a saúde, tem sido foco de diversos estudos (Anderson 1992, Pieters et al. 2008, Pooramini et al. 2009, Abasali e Mohamad 2010, Zhou e Wang 2012, Carvalho et al. 2009, Harikrishnan et al. 2011a, Toazza et al. 2013, Mahdavi et al. 2013, Haghghi e Rohani 2013, Sivagurunathan e Innocent 2014, Adel et al. 2015, Amin et al. 2015, Amirkhani e Firouzbakhsh 2015, Inoue et al. 2017, Altunoglu et al. 2017, Hoseinifar et al. 2017, Moghanlou et al. 2018). Esses produtos imunoestimulantes têm sido recomendados devido aos seus diversos benefícios, entre esses o estabelecimento da microbiota intestinal, aumento da taxa de crescimento, redução do estresse, melhoria da saúde dos peixes e redução de doenças parasitárias e infecciosas (Anderson 1992, Pieters et al. 2008, Pooramini et al. 2009, Zhou e Wang 2012, Carvalho et al. 2009, Harikrishnan et al. 2011a, Toazza 2013, Adel et al. 2015), entre outros. Porém, espécies de *Aeromonas* é um grupo de bactérias que mais tem causado problemas no cultivo intensivo de peixes, levando a elevadas taxas de mortalidade em diferentes espécies de peixes de produção intensiva. Entre tais bactérias, *Aeromonas hydrophila* é conhecida como um patógeno dominante, altamente resistente a antibióticos e causadora de vários danos aos peixes infectados (Saavedra et al. 2004, Doan 2013, Stratev e Vashin 2014, Song et al. 2014, Moghanlou et al. 2018). Todavia, os imunoestimulantes podem auxiliar na redução desses processos infecciosos que causam prejuízos no cultivo de pirarucus, reduzindo a mortalidade e melhorando os parâmetros de crescimento dos animais na piscicultura.

Os produtos imunoestimulantes são compostos de natureza variada que estimulam o sistema imunológico específico e não-específico, aumentando a resistência as doenças, devido à redução de estresse nos peixes suplementados (Haghghi e Rohani 2013, Biller-Takahashi et al. 2016). Assim, diferentes imunoestimulantes vem sendo utilizados como aditivos na dieta de peixes, visando a melhoria da qualidade nutricional e saúde dos animais cultivados (Anderson 1992, Toazza et al. 2013, Mahdavi et al. 2013, Haghghi e Rohani, 2013, Sivagurunathan e

Innocent 2014, Adel et al. 2015). Apesar dos benefícios dos imunostimulantes, esses não têm sido usados no cultivo intensivo de pirarucus, pois é necessário determinar quais produtos podem ser usados e as melhores concentrações a ser adicionadas na dieta. Assim, o presente estudo visa avaliar a eficiência de diferentes imunostimulantes comerciais e não-comercial no desempenho produtivo e imunologia de alevinos de pirarucu, após estresse de manejo e desafio com *A. hydrophila*.

### **1.1. O pirarucu *Arapaimas gigas***

*Arapaimas gigas* é um peixe carnívoro, endêmico da bacia amazônica pertencente a família Arapaimidae e ordem Osteoglossiformes. Este único representante dessa família é considerado a maior espécie de peixe de escamas da Amazônia, pois pode chegar a três metros de comprimento e 200 kg de peso (Silva et al. 2006, Araujo et al. 2009a,b, Oliveira et al. 2012, Silva e Duncan 2016, Hoshino et al. 2017, Ramos et al. 2018). Peixe da região tropical de água doce da América do Sul, pode ser encontrado no Peru, Bolívia, Guiana e Brasil, preferencialmente, nas bacias hidrográficas do rio Amazonas e Tocantins-Araguaia (Silva e Duncan 2016).

Esse peixe apresenta respiração bimodal, sendo que na sua fase de alevino a sua respiração é exclusivamente branquial. Na vida adulta, como as brânquias não são capazes de obter O<sub>2</sub> suficiente para atender às necessidades fisiológicas do animal, a absorção de O<sub>2</sub> do ar atmosférico ocorre principalmente pela bexiga natatória modificada, tornando as brânquias, após a remodelação do epitélio branquial, responsáveis pela regulação de íons (Ramos et al. 2018).

O cultivo de peixes carnívoros como o pirarucu, em geral, apresenta limitações devido ao baixo rendimento das cadeias alimentares, pela perda de energia em cada mudança de nível trófico (Imbiriba et al. 2001). No entanto, vários estudos já foram realizados sobre o cultivo do pirarucu em cativeiro desde a década de 40. Esses estudos ressaltam as boas características zootécnicas desse peixe, tais como: fácil adaptação aos alimentos artificiais balanceados comercialmente (ração); rápido crescimento, podendo chegar a 7-10 kg no primeiro ano de cultivo; boa tolerância às altas densidades de estocagem e relativa rusticidade ao manuseio (Cavero et al. 2003, Scorvo Filho et al. 2004, Araujo et al. 2009b, Drumond et al. 2010, Sebrae 2010, Oliveira et al. 2012, Silva e Duncan 2016, Hoshino et al. 2017, Poietti-junior et al. 2017). Além disso, tem uma ótima aceitação no mercado nacional e internacional, devido a sua carne de cor clara, magra, tenra e de alta qualidade, livre de espinhas intramusculares e por apresentar

um alto rendimento de filé (acima de 45%), superando o rendimento alcançado pela maioria dos peixes atualmente cultivados no Brasil (Cavero et al. 2003, Scorvo Filho et al. 2004, Sebrae 2010).

Além da baixa produção nacional de pirarucu, ocasionada pelas dificuldades no domínio de sua reprodução em cativeiro (Sebrae 2010), problemas sanitários tem outros entraves para o sucesso da produção desse peixe amazônico de importância para a piscicultura amazônica e brasileira, pois as doenças podem ser responsáveis por perdas econômicas significativas, levando o produtor a um desestímulo na atividade (Delgado et al. 2007, Araujo et al. 2009 a,b). Alevinos de pirarucu de cultivo intensivo tem sido parasitados por monogêneas *Dawestrema* sp., *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides*; protozoários *Trichodina* sp., *Ichthyobodo* sp., *Trichodina heterodentata*, *Trichodina ferai* e *Ichthyophthirius multifiliis*; crustáceos *Argulus*; nematoides *Camallanus tridentatus*, *Terranova serrata* e *Goezia spinulosa* e *Procamallanus Spirocamallanus inopinatus* e ancantocéfalos *Polyacanthorhynchus macrorhynchus* (Cavero e Crescêncio 2003, Delgado et al. 2007, Araujo et al. 2009 a,b, Miranda et al. 2012, Gaines et al. 2012, Marinho et al. 2013).

Embora sejam frequentes as bacterioses em pirarucu, essas são ainda pouco conhecidas (Proeti-Junior et al. 2017). Porém, em *O. niloticus* (Belém-Costa e Cyrino 2006, Almeida et al 2013, Aboyadak et al. 2015), *Piaractus mesopotamicus* (Belém-Costa e Cyrino 2006), *Cyprinus carpio* (Alsaphar e Al-Faragi 2012), *Pangasius bocourti* (Doan 2013), *Catla catla* (Sujatha et al. 2013) e *Oncorhynchus mykiss* (Saavedra et al. 2004) tem sido diagnosticado enfermidades causadas por *A. hydrophila*. Em geral, a baixa qualidade da água, falta de assepsia nos viveiros, excesso de matéria orgânica e alimentação inadequada são fatores que estão diretamente relacionados às doenças infecciosas nos peixes de cultivo intensivo (Schalch e Garcia 2011).

## **1.2. *Aeromonas hydrophila* e ambiente de cultivo**

*Aeromonas hydrophila* é um patógeno considerado oportunista, pois necessita de meio favorável para a sua proliferação. Por exemplo, um hospedeiro que esteja com o organismo em baixa imunidade, torna os peixes mais susceptíveis a tais invasores, quando o ambiente de cultivo proporciona essas condições de estresse (Saavedra et al. 2004). Infecções bacterianas são responsáveis por grande parte das perdas econômicas em criações intensivas em todos os continentes, pois causam grande taxa de mortalidade na produção (Hazen et al. 1978, Aoki 1999, Saavedra et al. 2004, Plumb et al. 2011, Saad e Atallah et al., 2015, Poietti-junior et al. 2017). Assim, a identificação do(s) patógeno(s) causador(e)s de doenças infecciosas é de

extrema importância na piscicultura, principalmente para determinar medidas profiláticas adequadas e possíveis tratamentos (Costa 2004).

O patógeno *A. hydrophila*, uma bactéria Gram-negativa e anaeróbica facultativa, é altamente patogênica para animais aquáticos e terrestres tais como peixes, anfíbios, répteis, e também para bovinos e homem (Hazen et al. 1978, Aoki 1999, Saavedra et al. 2004, Plumb et al. 2011, Tekedar et al. 2015, Biller-Takahashi et al. 2016). Pode ser facilmente encontrada na água e sedimentos de viveiros ricos em matéria orgânica e mesmo na microbiota intestinal dos peixes (Hazen et al. 1978, Aoki 1999, Boijink e Brandão 2001, Rey et al. 2009). Devido a sua alta capacidade de adesão as células teciduais, essa bactéria é conhecida como um patógeno causador de ulcerações, septicemia hemorrágica e síndrome ulcerativa epizoótica em peixes de água doce (Aoki 1999, Saavedra et al. 2004, Plumb et al. 2011, Rey et al. 2009, Carraschi et al. 2012, Silva et al. 2012, Doan 2013, Stratev e Vashin 2014, Tran et al. 2015), danos esses, que podem levar a grande mortalidade nos viveiros de piscicultura.

As bacterioses manifestam-se, geralmente, sob três aspectos: resposta septicêmica, necrose do tegumento ou dos músculos, e reposta crônica proliferativa. Porém, em muitos casos somente um desses aspectos manifesta-se na infecção, pois os fatores ambientais e as características dos hospedeiros também influenciará na infecção e sintomatologia apresentada (Pavanelli et al. 2010).

Diversos estudos mostram que a susceptibilidade dos peixes inoculados com *A. hydrophila* pode variar entre as espécies de hospedeiros (Tabela 1), devido a diferentes fatores. A concentração letal (CL<sub>50</sub>) dessa bactéria depende da concentração usada, virulência da cepa, via de inoculação, temperatura ambiental e idade dos peixes inoculados (Andrade et al. 2006, Rey et al. 2009, Oliveira et al. 2011, Plumb et al. 2011, Carraschi et al. 2012, Song et al. 2014, Kumar et al. 2016, Ruenkoed e Wang 2019). Vários fatores estão relacionados a virulência de *A. hydrophila* tais como os produtos extracelulares, incluindo aerolisinas e  $\alpha$ - e  $\beta$ -hemolisinas, entre outros. Assim, a composição dos produtos extracelulares de cepas de *A. hydrophila* podem ser diferentes, pois as condições do meio de cultura e temperatura também afetam sua composição (Rey et al. 2009). Além da idade dos peixes, as condições do sistema imunológico influenciam diretamente na mortalidade dos animais inoculados com essa bactéria (Oliveira et al. 2011, Ruenkoed e Wang 2019) podendo eles apresentar resistência ou susceptibilidade a determinada infecção.

**Tabela 1.** Concentração letal (CL<sub>50</sub>) de *Aeromonas hydrophila* para diversas espécies de peixes.

Espécie de peixe	CL <sub>50</sub> (UFC/mL <sup>-1</sup> )	Referências
<i>Channa striata</i>	4,1 x 10 <sup>8</sup>	Samayanpaulraj et al. (2019)
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	2,14 x 10 <sup>7</sup>	Ruenkoed e Wang (2019)
<i>Tor putitora</i>	1,74 x 10 <sup>5</sup>	Kumar et al.(2016)
<i>Megalobrama amblycephala</i>	5,0 x 10 <sup>5</sup>	Tran et al. (2015)
<i>Labeo rohita</i>	1,7 x 10 <sup>7</sup> e 1,1 x 10 <sup>8</sup>	Samal et al. (2014)
<i>Catla catla</i>	5,4 x 10 <sup>6</sup>	Sujatha et al. (2013)
<i>Brycon amazonicus</i>	6,7 x 10 <sup>11</sup>	Oliveira et al. (2011)
<i>Pangasius bocourti</i>	2,2 x 10 <sup>8</sup>	Doan (2013)
<i>Labeo rohita</i>	5,7 x 10 <sup>6</sup>	Bharadwaj et al. (2013)
<i>Cyprinus carpio</i>	0,3 x 10 <sup>10</sup>	Alsaphar e Al-Faragi (2012)
<i>Cyprinus carpio</i>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	Harikrishnan et al. (2003)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	1,5 x 10 <sup>8</sup>	Carraschi et al. (2012)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	2,4 x 10 <sup>7</sup>	Carraschi et al. (2012)
<i>Piaractus brachypomus</i>	5,8 x 10 <sup>7</sup>	Rey et al. (2009)
Híbrido de <i>Oreochromis</i> spp.	5,8 x 10 <sup>7</sup>	Rey et al. (2009)
<i>Oreochromis niloticus</i>	3,4 x 10 <sup>6</sup>	Pachanawan et al. (2008)
<i>Lates calcarifer</i>	7,4 x 10 <sup>10</sup>	Rengpipat et al. (2008)
<i>Brycon amazonicus</i>	4,6 x 10 <sup>11</sup>	Andrade et al. (2006)
<i>Rhamdia quelen</i>	1,3 x 10 <sup>9</sup> e 3,5 x 10 <sup>8</sup>	Boijink e Brandão (2001)
<i>Salmo trutta</i>	2 x 10 <sup>5</sup>	Santos et al. (1991)
<i>Anguilla japonica</i>	10 <sup>8</sup>	Santos et al. (1991)
<i>Plecoglossus altivelis</i>	8,6 x 10 <sup>4</sup>	Santos et al. (1991)
<i>Lepomis macrochirus</i>	10 <sup>8</sup>	Santos et al. (1991)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	3,2 x 10 <sup>4</sup> -10 <sup>8</sup>	Santos et al. (1991)

Em *Labeo rohita*, *A. hydrophila* causou mortalidade de 100% em 24 horas após a inoculação (Bharadwaj et al. 2013), enquanto Samal et al. (2014) observaram que a mortalidade após desafio desse mesmo peixe, teve início somente após 36 horas da inoculação, com o aparecimento de sinais clínicos. Assim, estudos mostram que o aparecimento dos sinais clínicos ocorrem somente após 24 horas da inoculação de *A. hydrophila* e a mortalidade é mais frequente após 48 horas da infecção (Santos et al. 1991, Boijink e Brandão 2001, Carraschi et al. 2012, Oliveira et al. 2011). Portanto, avaliações de infecção experimentais são necessárias para cada espécie de peixe, permitindo o desenvolvimento de protocolos de profilaxia e tratamento mais eficientes contra esse perigoso patógeno de cultivo de água doce (Carraschi et al. 2012).



Em geral, os sinais clínicos de bacteriose causada por *A. hydrophila* são ascite contendo fluido mucoso e amarelado, exoftalmia, úlceras com bordas avermelhadas no local da inoculação, manchas no corpo, erosão das nadadeiras, lesões que deixaram a musculatura exposta no poro genital e ânus, brânquias e órgãos internos pálidos e flácidos, pontos hemorrágicas no fígado, inchaço do intestino e rim (Santos et al. 1991, Bojink e Brandão 2001, Rey et al. 2009, Carraschi et al. 2012, Oliveira et al. 2011, Alsaphar e Al-Faragi, 2012, Doan 2013, Samal et al. 2014, Song et al. 2014, Poietti- Junior et al. 2017). Além disso, para peixes em cultivo pode ocorrer também uma redução do apetite e natação errática (Samal et al. 2014, Poietti- Junior et al. 2017).

Em *A. gigas*, as aeromonoses associadas edwardsielose, além dos sintomas já descritos, causaram também anorexia, perda do equilíbrio, redução dos movimentos respiratórios, focos hemorrágicos, lesões com formas e extensões diferentes, principalmente na nadadeira caudal e bexiga natatória modificada, esplenomegalia, aumento da vesícula biliar, fluido mucoso amarelado e sanguinolento na cavidade intraperitoneal, hiperemia e cavidade abdominal com edemaciamento (Poietti- Juinior et al. 2017). Em geral, esses sintomas externos são de fácil identificação pelos piscicultores, auxiliando assim no diagnóstico da bacteriose. Assim, são importantes os estudos sobre avaliação da dose letal de *A. hydrophila* em pirarucu, pois essa espécie de bactéria pode causar grande mortalidade de peixes no cultivo, levando a perdas econômicas significativas na produção da piscicultura.

### **1.3. O sangue e sistema imunológico dos peixes**

Os peixes são os primeiros vertebrados a desenvolver sistema imunológico inato e adaptativo, mas são desprovidos de medula óssea. Esses vertebrados aquáticos possuem os órgãos do sistema linfóide dividido em órgãos primários, constituído pelo rim e timo; e os órgãos secundários, constituído pelo baço e tecido linfóide associado ao intestino, conhecido como GALT e as brânquias (Van Muiswinkel 1995, Tavares-Dias e Moraes 2004). O rim desempenha papel de órgão hematopoiético, pois é o primeiro órgão que aparece linfócitos B, fazendo sua diferenciação. O timo constitui o local de desenvolvimento e maturação dos linfócitos T, enquanto que os órgãos secundários funcionam como primeira linha de defesa dos peixes (Tort et al. 2003). Os peixes, de modo geral, possuem timo e baço bem desenvolvidos, exceto as lampréias, que não possuem timo verdadeiro e tem baço rudimentar (Fijan 2002, Tavares-Dias e Moraes 2004).

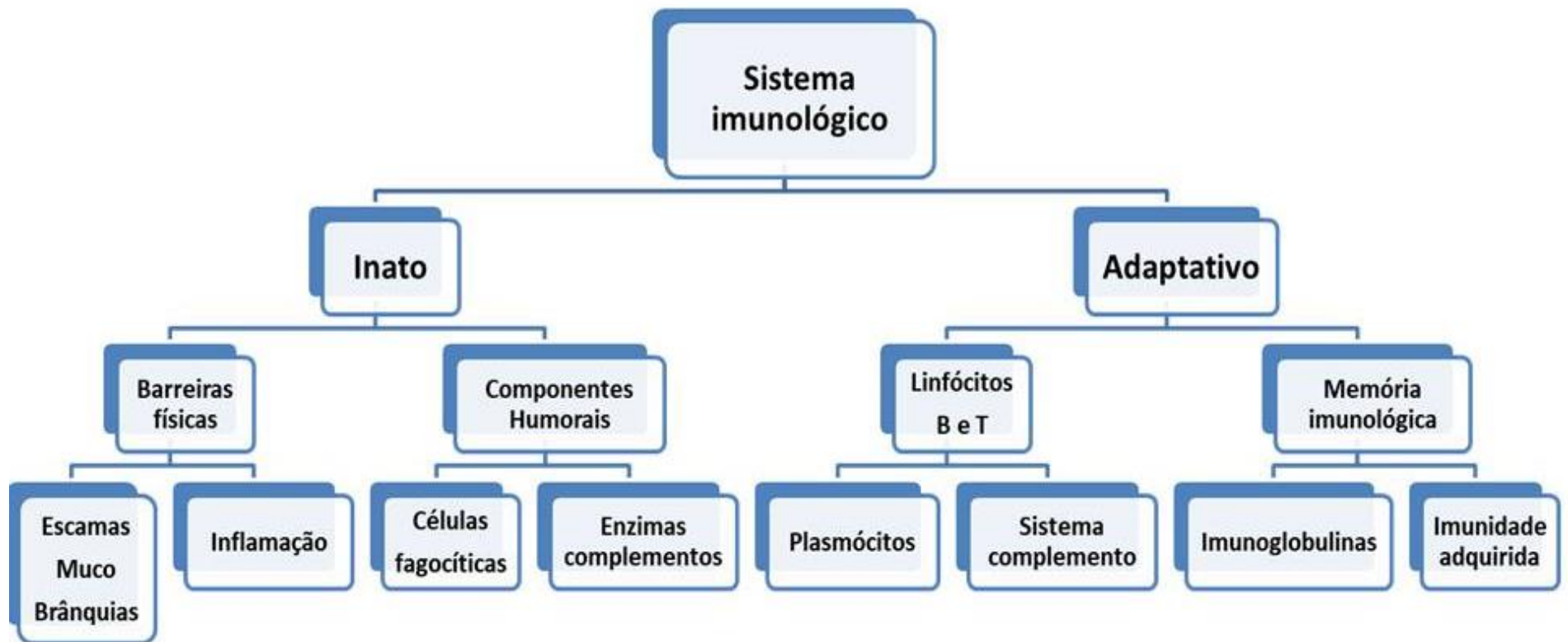
A formação da linhagem eritro-trombo-leucocitária nos teleósteos ocorre no rim e baço e de maneira similar ao de outros vertebrados. Assim, o sangue dos peixes possui eritrócitos e trombócitos nucleados, além de população de leucócitos tais como linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Porém, não foram determinadas ainda as células fonte pluripotente e progenitora dessas células sanguíneas em peixes. As formas precursoras de eosinófilos, basófilos e trombócitos também não foram ainda identificadas (Fijan 2002, Tavares-Dias e Moraes 2004).

Nos peixes, a hematopoiese sofre influência de diversos fatores biológicos e ambientais. O estresse, por exemplo, pode provocar aumento da atividade eritro-leucopoética (Tavares-Dias e Moraes 2004). Assim, hematócrito, glicose, cortisol, concentração de hemoglobina e número de linfócitos são consideradas variáveis sanguíneas indicadoras da resposta ao estresse em peixes (Iwama et al. 1995; Tavares-Dias e Moraes 2004, Lima et al. 2006, Martins et al. 2008), ocasionado por inúmeros fatores, dentre eles práticas de manejo, transporte, tratamentos e altas densidades de estocagem, entre outros fatores. Esses fatores produzem efeitos que ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático e provocam um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória ou adaptativa, habilitando o animal a superar as ameaças (Lima et al. 2006). O nível de glicose no sangue de peixes demonstra ser indicador sensível ao estresse ambiental (Iwama et al. 1995), pois nessa ocasião pode ocorrer uma considerável taxa de absorção de oxigênio pelas brânquias, em função do aumento da taxa de ventilação, da estimulação do fluxo branquial e da elevada capacidade de difusão do oxigênio (Lima et al. 2006).

Nos peixes teleósteos, uma característica peculiar dos tecidos hematopoéticos é a presença de centros de melanomacrófagos ou agregados de macrófagos no fígado, baço e rim. No fígado e baço os centros de melanomacrófagos contêm pigmentos marron-amarelados e a quantidade desses pigmentos podem variar entre as espécies de peixes e entre tecidos. Os centros de melanomacrófagos possuem importantes funções fisiológicas tais como a estocagem de eritrócitos, catabolismo de tecidos eritróides e o reaproveitamento de substâncias que podem ser reutilizadas na hematopoiese, como por exemplo, o ferro. Além disso, apresentam função imunológica como respostas humoral e inflamatória e estocam e destroem ou detoxificam substâncias exógenas e endógenas. Os pigmentos presentes no interior dos centros de melanomacrófagos apresentam atividade funcional, a hemosiderina que está relacionada com a estocagem e o reaproveitamento do ferro dos eritrócitos. A lipofucsina e ceróide derivados da peroxidação das células e organelas e melanina, estão relacionados aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Tavares-Dias e Moraes 2004).

Apesar da distinção na classificação do sistema de defesa em inato e adaptativo, sempre que um agente patogênico ataca o organismo, o sistema imunológico defende mediante a interação da maioria dos elementos que compõem o sistema imunológico, onde vários fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação (Fernandez et al. 2002, Biller-Takahashi et al. 2013). Assim, o sistema imunológico e inato dos peixes é responsável pela primeira linha de defesa (Figura 1), tendo um caráter geral e independente do reconhecimento das estruturas moleculares dos organismos invasores, atuando rapidamente na defesa (Fernandez et al. 2002, Van Muiswinkel 2006, Saurabh e Sahoo 2008). Para tal, forma-se barreiras físicas através do muco, escamas, brânquias e epiderme, imunócitos, células fagocíticas, células citotóxicas não específicas, células endoteliais e componentes humorais tais como a transferrina, lisozima, sistema complemento, inibidores de protease, anticorpos, lecitinas, pentraxinas, citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos; gerados pela secreção interna de vários tecidos e células (Magnadóttir 2006). Dessa forma, a imunidade inata consiste em impedir que agentes patogênicos tentem invadir o organismo, bloqueando a sua entrada ou mesmo eliminando-os antes que possam causar qualquer tipo de infecção (Fernandez et al. 2002).

A imunidade adaptativa é caracterizada pelo reconhecimento de antígeno específico e desenvolvimento da memória imunológica (Figura 1), necessitando de tempo para ser ativada e promover uma resposta específica e adequada contra cada patógeno específico (Van Muiswinkel 2006, Magnadóttir 2006, Saurabh e Sahoo 2008). Esse tipo de imunidade é subdividida em resposta humoral e celular, envolvendo os órgão e tecidos linfóides (primários e secundários), dependendo diretamente da atividade dos linfócitos T e B, que atuam na produção de receptores específicos tais como as imunoglobulinas (Ig), fagócitos, linfócitos Natural Killer (NK), proteínas plasmáticas do sistema complemento e lisozima (Eto et al. 2013). Portanto, o sistema imunológico inato e adaptativo (Figura 1) tem a função de proteger o organismo contra infecções que podem levar o hospedeiro a morte. Além disso, responde aos agentes estressores e variação de temperatura ambiental (Lie et al. 1989).



**Figura 1.** Esquema diagramático simplificando os compartimentos do sistema imunológico em peixes teleósteos. Baseado em: Fernando et al. (2002), Van Muiswinkel (2006), Rubio-Godoy (2010), Uribe et al. (2011) e Fu et al. (2013).

### 1.3.1. Células e proteínas do sistema imunológico de peixes

Em peixes, a exemplo de outros vertebrados, várias populações de leucócitos (linfócitos, monócitos/macrófagos, granulócitos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e células citotóxicas) participam do sistema imunológico. Os macrófagos e granulócitos são considerados células fagocíticas que atuam ingerindo bactérias e restos celulares e são importantes nos processos inflamatórios, onde ocorre a migração desses leucócitos para o local dos danos e, conseqüente, acúmulo de fluídos (Secombes 1996, Fernandez et al. 2002). Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune específica humoral, tais como a produção de anticorpos e aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imunológica (Fernandez et al. 2002). Porém, a função dos granulócitos nos peixes ainda não está bem definida, visto que esses também podem participar do processo inflamatório juntamente com os agranulócitos linfócitos e macrófagos (Tavares-Dias e Moraes 2004). Além disso, o número de leucócitos pode variar nos peixes, pois sofre influência de muitos fatores internos e externos tais como espécie, condições de coleta e armazenamento do sangue, idade, variações do ambiente, entre outros fatores (Fernandez et al. 2002, Magnadóttir 2006, Tavares-Dias e Moraes 2004).

Nos peixes, há ainda as células citotóxicas que tem como principal função a lise de células estranhas sem que essas expressem algum antígeno ativador da resposta imunológica específica. Assim, esse tipo de célula gera uma resposta imune não específica, pois não há reconhecimento de antígeno que estimula a resposta imunológica específica, nem formação de células monoclonais específicas ou qualquer memória imunológica. Tais células se diferenciam dos linfócitos que criam uma resposta imunológica específica contra cada patógeno com o qual entrou em contato (Uribe et al. 2011).

O sistema complemento é composto por um grupo de proteínas e componentes não-proteicos que estão envolvidos na imunidade inata e adaptativa. Podendo esse ser ativado ao longo de duas vias principais: via clássica, que é estimulada por complexos antígeno-anticorpo; e via alternativa, que é iniciada por contato com parede celular de microorganismos compostos por polissacarídeos (Van Muiswinkel 2006). Qualquer uma dessas vias compreende três fases - a fase de iniciação particular para cada uma das vias, a fase de amplificação em que é a ativação da fração C3, comum a todas as vias. Essa ativação ocorre através da clivagem de C3 em C3a e C3b. A última fase é a de ataque à membrana, e esta é a fase de ativação comum a

essas três vias, que terminam na lise celular das células dos organismos invasores (Arosa et al. 2007).

Nos peixes, o sistema complemento participa dos seguintes processos biológicos: fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (Secombes 1996, Rubio-Godoya 2010). De modo geral, o sistema complemento possui atividade bactericida, principalmente contra cepas bacterianas Gram-negativas (Rubio-Godoya 2010), o que auxilia principalmente no desencadeamento da resposta imunológica contra patógenos causadores de perdas em cultivo intensivo.

As lisozimas são enzimas de origem mucolítica e leucocitária importante do sistema imunológico inato presente em diversos órgãos, e seus níveis podem variar entre as espécies de peixes (Lie et al. 1989, Fu et al. 2013). Essas atuam na mediação e proteção contra microrganismos invasores, principalmente contra bactérias Gram-positivas, enquanto que bactérias Gram-negativas não são danificadas diretamente pelas lisozimas. Porém, as lisozimas atuam em conjunto com o sistema complemento, que danifica a camada de peptidoglicano, deixando o caminho livre para a ação da enzima (Saurabh e Sahoo 2008, Van Muiswinkel 2006), afetando até mesmo agentes patogênicos graves como *Aeromonas salmonicida* e *A. hydrophila* (Ellis 1999), por exemplo. Além da ação bactericida, as lisozimas possuem ação fagocítica por ativação direta de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e macrófagos, provendo a opsonização de patógenos invasores (Lie et al. 1989, Saurabh e Sahoo 2008, Rubio-Godoya 2010). Aumento da transcrição de genes ligados as lisozimas após a infecção experimental com *Edwardsiella tarda* em *Paralichthys olivaceus* confirma a expressão e sua atividade microbicida em teleósteos (Hikima et al. 1997).

Em peixes de água doce, as lisozimas estão presentes principalmente em tecidos ricos em leucócitos tais como: brânquias, baço, rins, trato digestivo, células do sistema imune (neutrófilos e macrófagos peritoneais), células vermelhas do sangue, cecos pilóricos, estômago, intestino, pele, mucosas (Lie et al. 1989). Segundo Ramos et al. (2018), nesses locais existem muitas células com extensos citoplasmas, que excretam muco, sendo esse muco rico em substâncias como lisozimas, imunoglobulinas, anidrase carbônica, componentes do sistema complemento, citocinas, proteína reativo C e enzimas proteolíticas, todas essas importantes para a ação do imunidade inata. Tais enzimas na maioria dos casos tem alta atividade bacteriolítica contra *A. salmonicida* e *A. hydrophila*, *Carnobacterium piscicola*, *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum*, entre outras que também são patogênicas. Além disso, em estudos realizados por Lie et al. (1989) foi observado que dentre os órgãos com presença de lisozima, o rim é o que apresentava uma maior atividade e produção, diferentemente dos dados apresentados por

Lindsay (1986), que mostraram uma diferenciação na produção de lisozimas entre os órgãos estudados. Portanto, a resposta imune inata em peixes demonstra grande importância quando comparada com a imunidade adquirida visto que as lisozimas são um parâmetro qualitativo e quantitativo na resposta imunológica contra infecções bacterianas (Fu et al. 2013). Fu et al. (2013) sugerem que genes do tipo c e g relacionados a produção de lisozimas desempenham papel importante na resistência aos agentes bacterianos em peixes.

A importância dos níveis de lisozimas ou sua atividade na imunidade inata de peixes está bem documentada, devida a atividade lítica contra bactérias. Ela se divide em  $\beta$ -1, 4, ligações glicosídicas entre o ácido N-acetilglucosamina e N-acetilglucosamina nas paredes celulares de bactérias Gram-positivas, impedindo-os de invadir o hospedeiro. Quando a parede celular externa de bactérias Gram-negativas é rompida devido à ação de enzimas do sistema complemento e outras, expõe a camada de peptidoglicano interior das bactérias, em seguida, torna-se eficaz a atividade das lisozimas (Lie et al. 1989).

Lisozimas podem ser medidas quantitativamente por meio de método turbidimétrico com base na lise de bactérias Gram-positivas, *Micrococcus lysodeikticus* (Lie et al. 1989, Abreu et al. 2009, Fu et al. 2013), podendo ser também determinadas no soro ou plasma. Porém, Abreu et al. (2009) mostram que essa enzima encontra-se em maior nível no soro quando comparado ao plasma. Portanto, a resposta gerada pelas lisozimas a infecções bacterianas antes da ativação da resposta adquirida é de grande importância para a resposta imunológica inata em peixes, sendo essas enzimas um parâmetro qualitativo e quantitativo desta resposta.

Em samonídeos, foi detectada a presença de duas isoformas de lisozimas com potencial bactericida contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, ativadas sem a necessidade do sistema complemento, ao contrário do que ocorre em mamíferos, em que as lisozimas são ativadas contra bactérias Gram-negativas somente após ativação do sistema complemento (Yousif et al. 1991). Portanto, em peixes, a resposta inata é uma importante ferramenta de defesa contra inúmeros patógenos, sendo compensatório à resposta imunológica adquirida, que se desenvolve lentamente em relação aos vertebrados mais recentes. Além disso, a resposta imunológica sofre influência da temperatura ambiental, sendo necessária a regulação da temperatura ideal para cada espécie manter sua resposta imunológica adquirida equilibrada (Clem et al. 1984, Bly e Clem 1994, Magnadóttir 2006), bem como a resposta inata.

As imunoglobulinas, fazem parte tanto do sistema imunológico inato quanto do sistema imunológico adaptativo dos animais, nos mamíferos, as principais imunoglobulinas, que são anticorpos que possuem papel importante na resposta de defesa das regiões das mucosas (Zimmerman et al. 2011). Esses anticorpos são glicoproteínas plasmáticas circulantes, do tipo

das gamaglobulinas, cada uma interage especificamente com determinado antígeno (epítopo) responsável por estimular sua formação. São secretados pelos plasmócitos resultantes da proliferação e diferenciação do linfócito B. As Ig possuem função de combinar-se especificamente com o epítopo que ela reconhece, provocando o aparecimento de sinais químicos indicando aos outros componentes do sistema imunitário, que há um invasor no organismo. Algumas Igs possuem a capacidade de aglutinar células e precipitar antígenos solúveis, facilitando a fagocitose de microorganismo.

Em peixes teleósteos, já foram identificadas IgM, IgD, IgT ou IgZ (Zhang et al. 2011, Zimmerman et al. 2011, Dias et al. 2015). Porém, estudos apontam apenas para duas classes de imunoglobulinas, IgM e IgD, sendo a primeira a única classe de imunoglobulinas que atua em compartimentos sistêmicos e nas mucosas, como também no plasma, muco e bile (Eto et al. 2013). A terceira cadeia de isótipo IgT/IgZ, foi identificado somente em *Danio rerio* (Danilova et al. 2005) e *O. mykiss* (Hansen et al. 2006). IgD é expressa em pequenas quantidades durante os estágios embrionários e em juvenis de peixes, aumentando com o desenvolvimento. Porém, em *D. rerio* a presença de IgM, IgZ, IgD ocorre durante todo o desenvolvimento dos peixes, com maior predominância de IgM na fase adulta (Zimmerman et al. 2011). As concentração de IgM podem variar entre as espécies de peixes. Em salmonídeos, a presença de IgM no soro é extremamente baixa quando comparada com a *C. carpio*, *Carassius auratus*, *Tinca tinca*, *Trematomus bernacchii*, *Trematomus hansonii*, *Trematomus newnesi* e *Anguilla japonica* (Scapigliati et al. 1997, Uchida et al. 2000). Estudos realizados com *Gadus morhua* relataram que a presença de IgM esta relacionada com o tamanho dos peixes (Magnadóttir et al. 1999) e com condições ambientais de temperatura. Além disso, a resposta imunológica da pele e brânquias é importante, pois estes órgãos estão em contato direto com o ambiente (Uribe et al. 2011). As Ig estão relacionadas a resposta imune específica, ou seja, atuam contra patógenos que venceram todas as barreiras inatas até instalar-se e que poderiam causar danos ao organismo dos peixes hospedeiros. Portanto, as Igs podem variar de acordo com os níveis de imunostimulantes adicionado a dieta de peixes, pois há um estímulo a sua produção quando inseridos substâncias na alimentação.

### **1.3.2. Atividade respiratória de leucócitos em peixes**

Nos peixes, a resposta inflamatória é realizada principalmente por células fagocíticas, tais como linfócitos B, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos e eosinófilos, as quais possuem capacidades fagocíticas em grau variado. Macrófagos e neutrófilos possuem uma grande



quantidade de moléculas antimicrobianas que estão no interior dos grânulos e lisossomas das células, realizando assim a maior atividade fagocitária (Abreu et al. 2009). Por sua vez, a fagocitose é acompanhada por uma atividade metabólica de grande intensidade das células, com elevado consumo de oxigênio. Os leucócitos aumentam seu consumo de oxigênio através da NADPH oxidase e geram várias espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) em um processo chamado de explosão respiratória (*burst respiratory*). Superóxido e peróxido de hidrogênio são ROS altamente tóxicos e formam a base de um potente sistema antibacteriano (Biller-Takahashi et al. 2013).

A habilidade de um patógeno em causar doença está relacionada com sua habilidade de escapar da fagocitose. Assim, a explosão respiratória é um importante mecanismo de eliminação de patógenos nos peixes (Tortora et al. 2012). Vários estudos relataram que suplementação com plantas imunostimulantes tem mostrado bons resultados no incremento da atividade fagocitária realizada pelos neutrófilos (Dalmo e Seljelid 1995, Dalmo et al. 1996, Dügencia et al. 2003, Rao et al. 2006, Harikrishnan et al. 2010, Asimi et al. 2015), o que consequentemente, confere maior proteção aos peixes. Em *L. rohita* alimentados com extrato de *Syzygium aromaticum* houve aumento da atividade antioxidante (Asimi et al. 2015). Porém, em *O. mykiss* alimentados com 1% de *Zingiber officinale*, estudos da explosão respiratória, detectaram grande produção intracelular de anion superóxido pela formação de cristais de formazano, que possibilitou uma maior atividade bactericida após infecções bacterianas (Dügenci et al. 2003), mostrando que a alimentação esta diretamente ligada a fatores imunológicos e defesa do organismo dos peixes.

#### **1.4. Uso de imunostimulantes no desempenho de crescimento e imunidade de peixes**

Nas últimas décadas, devido ao aperfeiçoamento do conhecimento sobre o sistema imunológico dos peixes, a indústria da aquicultura vem investindo no desenvolvimento de novos produtos que atuem no ganho de crescimento e imunidade desses vertebrados, visando reduzir os níveis de infecções causadas por parasitos e patógenos (Magnadóttir 2010, Harikrishnan et al. 2011a,b, Adel et al. 2015) e garantir o incremento da produção e produtividade na piscicultura.

Em geral, antibióticos são frequentemente utilizados para controlar doenças, causadas principalmente por estresse de manejo, infecções bacterianas e parasitárias, as quais podem ser fatores limitantes para produção nas pisciculturas comerciais (Anderson 1992, Toazza et al.

2013, Moghanlou et al. 2018), isso tem aumentado o interesse por esses produtos terapêuticos e outros agentes quimioterapêuticos. Porém, há um risco crescente das cepas bacterianas desenvolver resistência aos antibióticos usados com grande frequência e indiscriminadamente (Mohamad e Abasali 2010, Harikrishnan et al. 2011b, Asimi et al. 2015). Assim, recentemente, tem aumentado o interesse dos pesquisadores e produtores no uso de diferentes imunoestimulantes, na tentativa de reduzir tais problemas na piscicultura (Anderson 1992, Toazza et al. 2013).

A alternativa tem sido o uso de dietas a base de extrato de plantas medicinais, microrganismos tais como leveduras e bactérias probióticas e outros imunoestimulantes, ou parte desses microrganismos para imunoestimular a imunidade dos peixes, protegendo-os contra doenças relacionadas ao estresse causado por manejo, classificação dos animais, transferência de viveiros, desova artificial, além de incrementar o seu crescimento (Tabela 2). Os imunoestimulantes tem a função de auxiliar as células fagocíticas a aumentar sua atividade bactericida e estimular as células Natural-Killer, sistema complemento, atividade de lisozimas e respostas de anticorpos em peixes e outros enzimas de defesa, reforçando a proteção contra doenças infecciosas (Harikrishnan et al. 2011b) e parasitárias.

**Tabela 2.** Produtos imunostimulantes utilizados em peixes. ↓: Redução, ↑: Aumento, ⇆: Não houve diferenças significativas, WBC: Leucócitos, RBC: Eritrócitos e Hb: Hemoglobina.

Imunostimulantes	Espécies de peixe	Eficácia	Referências
Alginato ergosan	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Conversão alimentar ↓ Mortalidade	Leonhardt et al. (2011)
Alginato de sódio	<i>Epinephelus coioides</i>	↓ Mortalidade por <i>Streptococcus</i> sp. e iridovirus	Yeh et al. (2008)
Alginatos (high-M alginato®)	<i>Gadus morhua</i>	↓ Mortalidade por <i>Aeromonas salmonicida</i>	Vollstad et al. (2006)
Alginato de sódio	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	↓ Mortalidade por <i>Streptococcus</i> sp. ↓ Mortalidade por iridovirus	Chiu et al. (2008)
Ácidos algínicos	<i>Cyprinus carpio</i>	↓ Mortalidade por <i>Vibrio anguillarum</i>	Huttenhuis et al. (2006)
Aquavac (Ergosan®)	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ RBC, WBC, eritroblastos e trombócitos	Garcia et al. (2012)
AquateFish®	<i>Oreochromis niloticus</i>	↓ Mortalidade ↑ Integridade intestinal ↑ Resistência a ectoparasitos	Pádua et al. (2014, 2015)
ArtinM ( <i>Artocarpus integrifolia</i> )	<i>Oreochromis niloticus</i>	↓ Mortalidade por <i>Streptococcus agalactiae</i>	Toazza et al. (2013)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Desempenho ↓ Mortalidade	Costa et al. (2011)
<i>Chlorella</i> sp.	<i>Carassius auratus gibelio</i>	↑ Desempenho ↑ Imunidade	Xu et al. (2014)
	<i>Labeo rohita</i>	↑ Lisozima, ↑ Complemento, ↑ Atividade oxidativa ↑ Superóxido dismutase ↓ Atividade myloperoxidase ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Giri et al. (2016)
Levamisol	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	⇆ Lisozima ⇆ Proteína, albumina e globulina ⇆ WBC, bust respiratório ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Biller-Takahashi et al. (2016)
Levamisol	<i>Labeo rohita</i>	↑ Imunidade	Wijendra e Pathiratne (2007)

**Tabela 2. Continuação...** ↓: Redução, ↑: Aumento, ∓: Não houve diferenças significativas  
WBC: Leucócitos, RBC: Eritrócitos e Hb: Hemoglobina.

Levamisol, quitosana e quitina	<i>Cyprinus carpio</i>	↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Gopalakannan e Arul (2006)
MycosorbA+®	<i>Arapaima gigas</i>	↑Desempenho ↓Fator de condição ↑Ht, Hb, RBC e índices hematimétricos ↓glicose e triglicérides ↑colesterol	Hoshino et al. (2017)
Quitosana	<i>Lates calcarifer</i>	↑ RBC, WBC, Hb, proteína, albumina, globulina ↑Atividade Oxidativa, lisozima, atividades bactericidas ↓ Mortalidade por <i>Vibrio anguillarum</i>	Ranjan et al. (2014)
Vitamina C e Vitamina E	<i>Arapaima gigas</i>	↑Desempenho ↑RBC, Hb, WBC ↓ Proteínas totais, glicose	Matos et al. (2003)
Ácido ascórbico	<i>Arapaima gigas</i>	↑Desempenho ↓Conversão alimentar	Silva et al. (2006)
β-glicano (Hoplit™)	<i>Rutilus frisii</i>	↑Desempenho ↑RBC, Hb, WBC ↑Microbiota intestinal ↓Mortalidade	Rufchaie e Hoseinifar (2014)
β-glicano β-glicano	<i>Oncorhynchus Mykiss</i> <i>Piaractus mesopotamicus</i>	↑ microbioma intestinal ↑Lisozimas ↓WBC ↓Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Schmitt et al. (2015) Biller-Takahashi et al. (2014)
β-glicano	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↓ infecção por <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Lauridsen e Buchmann (2010)
β-1,3/1,6-glicano	<i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus keta</i>	↓infecção por <i>Loma salmonae</i> ↓infecção por <i>Saprolegnia</i> sp.	Guselle et al. (2006) Kiseleva et al. (2014)
β-1,3-glicano	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑Lisozimas ↓ infecção por <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Jaafar et al. (2011)
β-glicano, peptidoglicano, vitamina C e E	A <sub>3a</sub> - <i>Rachycentron canadum</i>	↑Desempenho ↑ Lisozima ↑Complemento C3 ↑Atividade Oxidativa ↓Mortalidade por <i>Vibrio harveyi</i>	Donga et al. (2015)

Tabela 2. Continuação...

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Huso huso</i>	↑Desempenho ↓Mortalidade ↓colesterol, glicose e proteína total ↓Microbiota intestinal	Hoseinifar et al. (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Labeo rohita</i>	↑Desempenho ↑Imunidade inata ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Tewary e Patra (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oreochromis</i> sp.	↑ Conversão alimentar ↑RBC, Hb ↓Lisozima ↓Atividade oxidativa ↑ Mortalidade por <i>Streptococcus agalactiae</i>	Amin et al. (2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑Imunidade ↑Atividade oxidativa	Manoppo et al. (2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Imunidade	Manurung et al. (2013)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Epinephelus coioides</i>	↓Mortalidade <i>Streptococcus</i> sp. e iridovírus ↑WBC, bust respiratório superóxido dismutase, lisozima, complemento CH50	Chiu et al. (2010)
<i>Aeromonas sobria</i> (GC2 <sup>®</sup> )	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↓ infecção por <i>Ichthyophthirius</i> <i>multifiliis</i>	Pieters et al. (2008)
<i>Shewanella xiamenensis</i> <i>Shewanella xiamenensis</i> , e <i>Aeromonas veronii</i>	<i>Ctenopharyngodon</i> <i>idellus</i>	↑Complemento C3 ↑Imunidade inata ↑Atividade oxidativa ↑Lisozimas, ↑imunoglobulinas ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Wu et al. (2015)
<i>Microcystis</i> sp.	<i>Oreochromis niloticus</i>	↓ Desempenho ↓Mortalidade	Costa et al. (2011)
<i>Adenocalymna alliaceum</i> e <i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Colossoma</i> <i>macropomum</i>	↓Infecção por Monogenoides	Boijink et al. (2011)
<i>Allium sativum</i>	<i>Colossoma</i> <i>macropomum</i>	↑Desempenho ↑RBC, WBC, Proteínas totais ↓ <i>Anacanthorus</i> <i>spathulatus</i>	Inoue et al. (2016)

Tabela 2. Continuação...

<i>Allium sativum</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑Desempenho ↑RBC, Hct ↑WBC, bust respiratório, lisozima, ↓Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Nya e Austin (2009)
<i>Allium sativum</i>	<i>Labeo rohita</i>	↑ RBC, WBC ↑Lisozima e atividade bactericida ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Sahu et al. (2007)
<i>Allium sativum</i>	<i>Carassius auratus</i>	↓Mortalidade por <i>Aeromonas spp.</i> e <i>Pseudomonas spp.</i>	Samal et al. (2005)
<i>Allium sativum</i>	<i>Huso huso</i>	↑Globulinas, albumina	Kanani et al. (2014)
<i>Allium sativum</i> e <i>Zingiber officinale</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	↓Proteína e albumina sérica ↑triglicédeos	Yılmaz e Ergun (2012)
<i>Allium sativum</i> , <i>Ocimum tenuifloru</i> , <i>Zingiber officinale</i> .	<i>Mystus montanus</i>	↑Desempenho ↑ WBC, RBC, Hb ↓Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Kumar et al. 2014
<i>Allium cepa</i>	<i>Huso huso</i>	↑Lisozima ↑Bust respiratório ↑Imunoglobulina ↓RBC, WBC, Hct ↓Proteína totais, triglicérides, colesterol, albumina, globulina	Akrami et al. (2015)
<i>Aloe vera</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	↑Desempenho ↑Imunidade ↓Estresse	Mahdavi et al. (2013)
<i>Andrographis paniculata</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	↑RBC e Hb ↑ Atividade oxidativa ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Muthu et al. (2015)
<i>Andrographis paniculata</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	↓ Mortalidade por <i>Streptococcus agalactiae</i>	Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2009)
<i>Cinnamomum sp.</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑Desempenho ↑WBC e linfócitos ↓ Mortalidade por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sivagurunathan et al. (2013)
<i>Cissus quadrangularis</i> e lipopolissacarídeos	<i>Lates calcarifer</i>	↑Desempenho ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Devakumar e Chinnasamy (2015)

Tabela 2. Continuação...

<i>Cotinus coggyria</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑Bust respiratório ↑Lisozima ↑Proteínas totais	Bilen et al. (2011)
Extrato de cardamomo e extrato de cravo	<i>Labeo rohita</i>	↑Desempenho ↑ Eficiência protéica ↑ Índice hepatossomático ↑Atividade antioxidante ↑Imunidade	Asimi et al. (2015)
<i>Mentha piperita</i>	<i>Salmo Trutta Caspius</i>	↑Desempenho zootécnico ↓Bioquímica ↑WBC, RBC, Hb	Adel et al., (2015)
<i>Mespilus germanica</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	↑Desempenho zootecnico ↑Lisozima, ↑imunoglobulinas, Peroxidase	Hoseinifar et al. (2017)
<i>Nigella sativa</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑Lisozima ↑Explosão respiratória Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Altunoglu et al. (2017)
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	↑Desempenho ↑WBC ↑RBC, Hb, proteínas totais, albumina e globulinas ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Amirkhani e Firouzbakhsh (2015)
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Oncorhynchus Mykiss</i>	↑Proteínas totais, albumina e globulinas ↑Lisozima ↑Atividade oxidativa	Pourmoghim et al. (2015)
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Astyanax altiparanae</i>	↑Desempenho ↑Efiência proteica	Ferreira et al. (2014)
<i>Psidium guajava</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Pachanawan et al. (2008)
<i>Punica granatum</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	↑Lisozima ↑Ativida oxidativa ↓ Mortalidade por <i>Lymphocystis</i>	Harikrishnan et al. (2010)
<i>Stachys lavandulifolia</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑Desempenho ↑RBC, triglicérido, colesterol ↑Imunoglobulinas, complementos e lisozima	Moghanlou et al. 2018

**Tabela 2. Continuação...**

<i>Tussilago farfara</i> , <i>Inula helenium</i> , <i>Brassica nigra</i> e <i>Chelidonium majus</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	↑WBC, RBC e Hb ↑Lisozima e proteínas totais ↑Albumina e globulina ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Mohamad e Abasali (2010)
<i>Zea mays</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ Atividade antioxidante ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Catap et al. (2015)
<i>Zeylanicum</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Cinnamomum</i> , <i>Juglans regia</i> e <i>Mentha piperita</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	↑Imunidade ↓ Mortalidade por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Abasali e Mohamad (2010)
<i>Zingiber officinale</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑ WBC, RBC e Hb ↑Lisozimas	Haghighi e Rohani (2013)
<i>Zingiber officinale</i> , <i>Viscum album</i> e <i>Urtica dioica</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑Atividade oxidativa ↑Desempenho zootécnico ↑Fator de condição ↑Imunidade ↑Proteínas no soro	Düğenci et al. (2003)
<i>Zingiber officinale</i>	<i>Huso huso</i>	↑Desempenho ↑RBC, Ht e Globulinas	Kanani et al. (2014)

Vários produtos tem se destacado como imunoestimulantes, dentre esses *S. cerevisiae*, derivado de fungo de cervejaria ou cana-de-açúcar. Essa levedura possui grande capacidade imunoestimulante quando usada em dietas para peixes, além de conter elevado teor de proteína (48% de peso seco) e alta digestibilidade (Lara-Flores et al. 2003, Amin et al. 2015). Leveduras *S. cerevisiae* contêm vários compostos imunoestimulantes tais como ácidos nucleicos de β-glicano, manano, oligossacáridos e quitina, mostrando boa resposta imunológica em diversos estudos realizados em peixes de cultivo. Diversos estudos tem sido direcionados para desafio bacteriano de peixes suplementados com dietas contendo *S. cerevisiae* ou outros produtos, incluindo plantas medicinais (Tabela 2).

Alguns estudos também tem sido realizados em peixes parasitados e alimentados com dietas contendo *S. cerevisiae*. Em *Paralichthys olivaceus* parasitados pelo ciliado *Uronema marinum*, suplementação com *L. plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *S. cerevisiae* aumentou a resposta imunológica não-específica, indicada pelo aumento da atividade escutidoidal e atividade de lisozimas. Porém, não foram significativas tais atividades em peixes infectados quando alimentados com dietas contendo *Lactobacillus sakai* e *B. subtilis* (Harikrishnan et al. 2011a). Pieters et al. (2008) relataram que a suplementação alimentar com



*A. sobria* em *O. mykiss* aumentou em 100% a sobrevivência dos peixes após desafio com *I. multifiliis*, enquanto nos controles houve 100% de mortalidade. Para essa mesma espécie de peixe suplementada na dieta com 5% de  $\beta$ -1,3-glicano, extraído *Euglena gracilis*, houve também proteção após desafio com *I. multifiliis* (Jaafar et al. 2011). Resultados similares foram relatados para peixes alimentados com 0,2% de  $\beta$ -glicano, extraído de *S. cerevisiae*, pois houve sucesso na imunização contra *I. multifiliis*, devido ao aumento dos níveis de lisozimas no plasma, que tem fortes efeitos antibacterianos (Lauridsen e Buchmann 2010). Guselle et al. (2006) também observaram eficiência de  $\beta$ -glicano contra *Loma salmonae*, mas relataram a necessidade de estudos para definir a concentração ideal desse imunoestimulante no controle dessa parasitose.

Em *Ctenopharyngodon idellus*, alimentados com fragmentos das bactérias *Shewanella xiamenensis*, *Shewanella xiamenensis* e *Aeromonas veronii* melhoraram o sistema imunológico inato e adaptativo, reduzindo a mortalidade dos peixes após o desafio com *A. hydrophila* (Wu et al. 2015). Similarmente, em *Cyprinus carpio*, alimentadas com *Andrographis paniculata*, houve uma redução da mortalidade causada por *A. hydrophila*, mas somente com a utilização de concentrações elevadas desse produto imunoestimulante (Muthu et al. 2015). Portanto, o uso de dieta a base de *S. cerevisiae* para alimentação de alevinos de pirarucu poderá conferir aumento no desempenho de crescimento e melhoria na sua imunidade contra *A. hydrophylla*, necessitando apenas de investigações sobre as concentrações mais adequadas que garantam esses efeitos positivos.

Produtos derivados de plantas medicinais representam uma promissora fonte de moléculas bioativas, sendo ao mesmo tempo prontamente disponível, barato e biocompatível. Plantas medicinais têm sido relatadas como tendo um largo espectro de promoção de crescimento, estimulação do apetite, atividade anti-microbiana, imunoestimulante, antiinflamatório e anti-estresse em todo o mundo (Bulfon et al. 2015, Moghanlou et al. 2018). Assim, extratos e óleos de plantas com potencial bioativo tem sido usados na suplementação de dietas de peixes, apresentando bons resultados no desempenho de crescimento e redução de mortalidade por infecções bacterianas, além de contribuir para a melhoria do sistema imunológico dos animais, deixando-os menos susceptíveis a doenças (Tabela 2).

Em *O. niloticus*, inoculação de ArtinM<sup>®</sup>, um produto derivado do extrato da semente de *Artocarpus integrifolia*, aumentou as haptotaxia de neutrófilos na cavidade peritoneal contribuindo para a melhoria da resistência contra *Streptococcus agalactiae* (Toazza et al. 2013), um patógeno que causa elevada mortalidade nesse peixe. Para essa mesma espécie tilápia, dietas com 1% de casca de *Cinnamomum* sp. melhorou a defesa imunológica dos peixes

quando infectados com *P. aeruginosa* (Sivagurunathan e Innocent 2014). A adição 1% de *Z. officinale* na dieta de *O. mykiss* melhorou a imunidade dos peixes (Haghighi e Rohani 2013). Em *C. carpio*, suplementação com 2,5% de extrato etanólico de *Aloe vera*, além de promover crescimento devido a estimulação do apetite dos peixes, reduziu o estresse e perdas de alimentos (Mahdavi et al. 2013).

A combinação de vários extratos de plantas com elevada atividade antimicrobiana tem sido também eficiente na redução da mortalidade causada por *A. hydrophila*. Mohamad e Abasali (2010) utilizando a combinação de extratos de *Inula helenium*, *Tussilago farfara*, *Brassica nigra*, *Echinacea purpurea* e *Chelidonium majus*, observaram uma melhoria nos parâmetros imunológicos avaliados, levando a uma redução da mortalidade e incremento no desempenho de crescimento de *C. carpio*, mesmo após infecção com *A. hydrophila*. Porém, devido a combinação desses vários extratos de plantas é necessário isolar e caracterizar os compostos e princípios ativos de cada uma para saber qual(is) tiveram ação imunoestimulante.

Na aquicultura, *Allium sativum* (alho) promove crescimento, melhoria do sistema imunológico, estimula o apetite e fortalece o organismo na reposta contra patógenos (Lee e Gao 2012). Em *C. macropomum* alimentados com dietas contendo 0, 15, 30 e 45 g/kg *A. sativum* não houve alterações nos parâmetros de crescimento. Porém, nos peixes alimentados com 30 de 45 g/kg houve redução na prevalência de monogeneas *Anacanthorus spathulatus* e melhoria na resposta dos leucócitos a essa infestação parasitária (Inoue et al. 2016). Porém, para *O. mykiss* a adição de 0,5 a 1,0g *A. sativum* melhorou o desempenho de crescimento, parâmetros imunológicos e reduziu a mortalidade devido a infecção por *A. hydrophylla* em 95% dos peixes suplementados (Nya e Austin 2009). Portanto, o uso de produtos imunoestimulantes a base de plantas medicinais também pode melhorar o sistema imunológico inato e adaptativo dos peixes (Harikrishnan et al. 2011a), além de aumentar a resistência a infecção por *A. hydrophylla*.

*Mansoa alliacea*, conhecido popularmente como cipó-alho ou alho-da-mata, é uma planta medicinal da família Bignoniaceae, com origem na Amazônia. Este arbusto semi-trepador chega a 3m ou mais de comprimento e as partes vegetais tem cheiro de alho. Ocorre em terra firme, longe dos corpos d'água, em áreas sombreadas tanto de capoeiras como bosques primários, em zonas tropicais com precipitação pluvial de 1.800 a 3.500 mm/ano e temperatura entre 20 e 30° C (Ferreira e Gonçalves 2007). O cipó-de-alho tem vários usos na medicina tradicional e entre eles, os mais citados são tratamento contra a gripe, febre, dor e inflamação de artrite e reumatismo. Apesar de todos os usos, ainda tem pequena aplicação como fitoterápico quando comparado ao *A. sativum*. Óleo essencial de *Mansoa* spp. contém polissulfetos de alila que contribuem para o aroma e sabor característicos do alho. A

composição química dos extratos orgânicos das espécies de *Mansoa* incluiu alcanos, alcanóis, triterpenóides, flavonóides, derivados do lapachol e derivado sulfurado aliína. O extrato aquoso frio das folhas de *M. alliacea* mostra a presença de ácidos aminados comuns de plantas, enquanto que a análise do extrato de metanol quente revelou a presença de um aminoácido dominante, aliina em conjunto com aminoácidos com o mesmo padrão que prevalece no extrato a frio. A percentagem de aliina encontrado nas folhas secas é 2,15% (Zoghbi et al. 2008). Atividade *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* foram demonstradas com 10 e 20 mg/mL de óleo essencial de *M. alliacea* (Olivera-Condori et al. 2013). Portanto, extrato de *M. alliacea* incluso na dieta de pirarucus poderia melhorar o desempenho de crescimento e imunidade dos peixes de acordo com a concentração administrada.

Em geral, o desafio com inoculação de bactérias, principalmente com *A. hydrophila*, em peixes alimentados com tem sido o principal modelo nas investigações relacionadas aos efeitos de produtos imunoestimulantes (Tabela 2), pois esta bactéria é um patógeno amplamente disseminado nos cultivos intensivos. Porém, outras espécies de bactérias tais como *Vibrio anguillarum* (Huttenhuis et al. 2006, Ranjan et al. 2014), *Streptococcus* spp. (Yeh et al. 2008, Chiu et al. 2008), *S. agalactiae* (Toazza et al. 2013, Amin et al. 2015), *Vibrio harveyi* (Donga et al. 2015), *P. aeruginosa* (Sivagurunathan et al. 2013), e mesmo vírus como *Lymphocystis* (Harikrishnan et al. 2010) e iridovirus (Yeh et al. 2008, Chiu et al. 2008) tem mostrado grande relevância quanto ao aspecto patogênico para peixes em cultivo, assim tem sido também foco de investigações. Portanto, esses resultados mostram a grande importância no uso de substâncias imunoestimulantes para alevinos de pirarucus, uma vez que melhoria na saúde dos peixes pode ser uma medida para aumentar a sua sobrevivência durante alevinagem, evitando o uso de produtos químicos comuns nas pisciculturas intensivas e epizootias.

## 2. PROBLEMAS

- Qual a concentração letal de *A. hydrophila* para alevinos de *A. gigas*?
- A suplementação alimentar com Levabom<sup>®</sup>, Aquatefish<sup>®</sup> e extrato de cipó-alho *M. alliacea* pode melhorar o desempenho de crescimento e sistema imunológico de *A. gigas*?
- Qual(is) imunostimulante(s) e nível de suplementação na dieta tem melhor resultado no desempenho de crescimento e sistema imunológico para *A. gigas* desafiados com *A. hydrophila* e estresse de manejo após alimentação?

### 3. HIPÓTESES

- A concentração letal de *A. hydrophila* para alevinos de *A. gigas* é elevada, pois este peixe apresenta boa tolerância;
- A suplementação na dieta de *A. gigas* com Levabom<sup>®</sup>, Aquatefish<sup>®</sup> e extrato de *M. alliacea* melhora o desempenho de crescimento e sistema imunológico dos peixes, devido ao seu efeito imunoestimulante;
- Maior nível de inclusão de Levabom<sup>®</sup>, Aquatefish<sup>®</sup> e extrato de *M. alliacea* na dieta *A. gigas* aumenta a resistência dos peixes contra *A. hydrophila*, pois aumenta a imunidade dos peixes suplementados.

#### 4. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do Levabom<sup>®</sup>, Aquatefish<sup>®</sup> e extrato de *M. alliacea* na dieta de alevinos de *A. gigas* no seu desempenho zootécnico e sistema imunológico.

##### 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração letal de *A. hydrophila* para *A. gigas*.
- Avaliar os efeitos do Aquatefish, Levabom e extrato de *M. alliacea* no desempenho de crescimento e em parâmetros de imunidade de alevinos de *A. gigas*;
- Determinar parâmetros fisiológicos e de imunidade em de *A. gigas* suplementados com diferentes concentrações de Aquatefish, Levabom e extrato de *M. Alliacea*;
- Avaliar os efeitos da suplementação de Aquatefish, Levabom e *M. alliacea* de alevinos de *A. gigas*, com diferentes níveis de imunostimulantes, após desafio com estresse de manejo e inoculação com *A. hydrophila*;
- Indicar o(s) imunostimulante(s) mais eficiente e sua concentração para melhoria do crescimento e imunidade de *A. gigas*.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- Abasali, H., e Mohamad, S. 2010. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulantes diets. *Agricultural Journal* 5: 163-172.
- Abreu, J.S., Marzocchi-Machado, C.M., Urbaczek, A.C., Fonseca, L.M., e Urbinati, E.C. 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Brazilian Journal of Biology* 69: 1133-1139.
- Aboyadak, I.M., Ali1, N.G. M., Goda, A.M.A.S., Aboelgalagel, W.H, e Salam, A.M.E. 2015. Molecular detection of *Aeromonas hydrophila* as the main cause of outbreak in Tilapia Farms in Egypt. *Journal of Aquaculture e Marine Biology* 2: 00045. doi: 10.15406/jamb.2015.02.00045
- Adel, M., Safari, R., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., e Esteban, M.A. 2015. Dietary peppermint (*Mentha piperita*) extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters (both at mucosal and systemic level) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish and Shellfish Immunology* 47: 623–629.
- Akrami, R., Gharaei, A., Razeghi, M., Galeshi, A. 2015. Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hematoebiochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. *Fish and Shellfish Immunology* 45: 828–834.
- Almeida, C.K.L, Lage, S.A.G., Oliveira, C.M.G., Santos, M., Espinola, M.A., e Santos, D.M.S. 2013. *Aeromonas hydrophila* em diferentes órgãos de tilapia do Nilo. (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1785). XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão, Recife, Pernambuco, Brasil.
- Alsaphar, S.A.A., e Al-Faragi, J.K.H. 2012. Detection and study of the experimental infection of *Aeromonas* strain in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine* 36: 222-230.
- Altunoglu, Y.C., Bilen, S., Ulu, e F. Biswas, G. 2017. Immune responses to methanolic extract of black cumin (*Nigella sativa*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 67: 103–109.
- Amin, M., Jusadi, D., Sukenda, A., e Harris, E. 2015. Growth performance, non-specific immun and antioxidant response of juvenile tilapia *Oreochromis* sp. feeding on brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplemented diet. *Pakistan Journal of Biotechnology* 12: 139-148.
- Amirkhani N., e Firouzbakhsh, F. 2015. Protective effects of basil (*Ocimum basilicum*) ethanolic extract supplementation diets against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research* 46: 716–724.

- Anderson, P.D. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases* 9: 281-307.
- Andrade, J.I.A., Ono, E.A., Brasil, E.M., Matsuura, T., Souza, R.T.Y.B., Tavares-Dias, M., Menezes, G.C., Fernandes, E.B., e Affonso, E.G. 2006. Lethal dose (LD<sub>50</sub>) of *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*, p. 209. In. Abstracts of the 41<sup>th</sup> Congress of the Brazilian Physiological Society. Ribeirao Preto, São Paulo, Brasil.
- Aoki, T. 1999. Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). P. 427-453 in P.T.K. Woo, D.W. Bruno. *Fish diseases and disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, CABI Publishing, London, Inglaterra.
- Araújo, C.S.O., Gomes, A.L., Tavares-Dias, M., Andrade, S.M.S., Belém-Costa, A., Borges, J.T., Queiroz, M.N., e Barbosa, M. 2009a. Parasitic Infection in Pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimatidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. *Veterinary Archive* 79: 499-507.
- Araújo, C.S.O., Tavares-Dias, M., Gomes A.L.S., Andrade, S.M.S., Lemos, J.R.G., Oliveira, A.T., Cruz, W.R., e Affonso, E.G. 2009b. Infecção parasitária e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae), cultivados no Estado do Amazonas, Brasil. Páginas 389-424 In M. Tavares-Dias. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Embrapa Amapá, Amapá, Brasil.
- Arosa, F.A., Cardoso, E.M., e Pacheco, F.C. 2007. Células e órgãos do Sistema immune Páginas 19-33 In E.M. Cardoso. *Fundamentos da imunologia*. Lisboa, Lidel, Portugal.
- Asimi, O.A., Sahu, N.P., e Pal, A. K. 2015. Immunomodulatory and growth response of *L. rohita* to dietary fortification of clove and/cardamom extract. *Global Journal of Fisheries and Aquaculture* 3: 230-237.
- Belém-Costa, A., e Cyrino, J.E.P. 2006. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Scientia Agricola* 63: 281-284.
- Bharadwaj, A., Abraham, T.J., e Joardar, S.N. 2013. Immune effector activities in challenged rohu, *Labeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas bacterin*. *Aquaculture* 16: 392-395.
- Bilen, S., Bulut, M., Bilen, A.M. 2011. Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 30 451- 455.
- Biller-Takahashi J.D., Montassier H.J., Takahashi, L.S., Urbinati, E.C. 2016. Levamisole promotes an adjuvant effect on the immunity of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) when immunized with *Aeromonas hydrophila*, even when provided in the diet. *Animal Feed Science and Technology* 211: 164-173.



- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Marzocchi-Machado, C.M., Zanuzzo, F.S., e Urbinati, E.C. 2014. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with  $\beta$ -glucan. *Brazilian Journal of Biology* 74: 698-703.
- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Saita, M.V., Gimbo, R.Y., e Urbinati, E.C. 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology* 73: 425-429.
- Bly, J. E., e Clem, L. W. 1994. Temperature adaptation of lymphocyte function in fish. Páginas 169-184 *In* A.R. Cossins (ed.). *Temperature adaptation of biological membranes*. Portland Press, London, Inglaterra. Boijink, C.L., e Brandão, D.A., 2001. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis e Jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciências Rural* 31: 503-507.
- Boijink, C.L., Guimarães, R.R., e Couto, H.A.R. 2011. Anais do seminário de produtividade agropecuária e benefícios socioambientais das pesquisas da embrapa Amazônia Ocidental. Documentos 88, EMBRAPA, Manaus, Amazonas, Brasil.
- Bulfon, C., Volpatti, D., e Galeotti, M. 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research* 46: 513-551.
- Carraschi, S.P., Cruz, C., Neto, J.G.M., Moraes, F.R., Rossi Júnior, O.D., Nader-Neto, A., e Bortoluzzi, N.L. 2012. Evaluation of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887). *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 4: 81-84.
- Carvalho, E.S., Gomes, L.C., Brandão, F.R., Crescêncio, R., Chagas, E.C., e Anselmo A.A.S. 2009. Uso do probiótico Efinol® durante o transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61: 1322-1327.
- Catap, E.S., Jimenez, M.R.R., e Tumbal, M.P.B. 2015. Immunostimulatory and anti-oxidative properties of corn silk from *Zea mays* L. in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 3: 30-36.
- Cavero, B.A.S., e Crescêncio, R. 2003. Controle de taxa de mortalidade de pirarucu, *Arapaima gigas* naturalmente parasitado por *Dawestrema* sp. (monogenea: Dactilogyridae). Páginas 107-115 *In* E.C. Urbinati, A. Ciryno, editores. XII simpósio Brasileiro de aquicultura. Aquabio, Goiânia, Brasil.
- Cavero, B.A.S., Pereira-Filho, M., Roubach, R., Ituassú, D.R., Gandra, A.L., e Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. *Pesquisa agropecuária Brasileira* 38: 103-107.

- Chiu, C.H., Cheng, C.H., Gua, W.R., Guu, Y.K, e Cheng, W. 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish e Shellfish Immunology* 29: 1053-1059.
- Chiu, S.T., Tsai, R.T., Hsu, J.P., Liu, C.H., e Cheng, W. 2008. Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Aquaculture* 277: 66-72.
- Clem, L.W., Faulmann, E., Miller, N.W., Elsaesser, C.F., Lobb, C.J., e Cuchens, M.A. 1984. Temperature mediated process in teleost immunity: differential effects of *in vitro* and *in vivo* temperature on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Developmental e Comparative Immunology* 8: 313-322.
- Costa, A.B. 2004. Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura, p. 387-403 in J.E. Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracolossi, N. Castognoli, Editores. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo, Brasil.
- Costa, F.T.M., Reis, F.R.C., Santos, J.M.S., Maciel, S.M., Biserra, T.S, Moreira, R.L., e Farias, W.R.L. 2011. *Chlorella* sp. como suplemento alimentar durante a larvicultura de tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 12: 1103-1115.
- Dalmo, R.A., Bogwald, J., Ingebrigtsen, K., e Seljelid, R. 1996. The immunomodulatory effect of laminaran [(1,3)-d-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., anterior kidney leukocytes after intraperitoneal, peroral and peranal administration. *Journal of Fish Diseases* 19: 449-457.
- Dalmo, R.A., e Seljelid, R. 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [(1,3)-d-glucan] on Atlantic Salmon, *S. salar*, macrophages *in vitro*. *Journal of Fish Diseases* 18: 175-185.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., e Steiner, L.A. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature Immunology* 6: 295-302.
- Delgado, P.M., Delgado, J.P.M., Rosa, J.V.A., e Orbe, I. 2011. Infestación masiva por *Perulernaea gamitanae* (Crustacea: Cyclopoida: Lernaecidae) en juveniles de gamitana, cultivados en la Amazonia peruana. *Veterinária México* 42: 59-64.
- Delgado, P.M., Chu-Koo F.W., Malta, J.C.O., Gomes, A.L.S., Varella, A.M.B., e Martin S.T. 2007. Fauna ectoparasitaria em alevinos de paiche *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

- cultivados en el Centro de Investigaciones de Quistococha, Loreto, Peru. *Folia Amazonica* 16: 23-27.
- Devakumar, C., e Chinnasamy, A. 2015. Dietary administration of natural immunostimulants on growth performance, haematological, biochemical parameters and disease resistance of Asian Sea bass *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture Research* 10: 1–15.
- Dias, C.A.C.V., Góes Filho, J.D., Oliveira, R.R.C., Sousa, R.L., Duncan, W.L.P., Ono, E., Mariúba, L.A., e Lameiras, J.L.V., Santos, M.C. 2015. Caracterização parcial das imunoglobulinas de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) e de *Colossoma macropomum* (Osteichthyes-Characidae) isoladas com ácido caprílico. *Scientia Amazonia* 4: 1-9.
- Doan, H.V. 2013. The LD50 of Asian Catfish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1870) challenge to pathogen *Aeromonas hydrophila* FW52 strain. *Pensee Journal* 75: 287-293.
- Donga, X.H., Geng, X., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., e Liu, X.Q. 2015. Effects of dietary immunostimulant combination on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus). *Aquaculture Research* 46: 840–849.
- Drumond, G.V.F., Caixeiro, A.P.A., Tavares-Dias, M., Marcon, J.L., Affonso, E.G. 2010. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. *Acta Amazonica* 40: 591-596.
- Dügencia, K.S., Ardab, N., e Candan, A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology* 88: 99–106.
- Ellis, A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 291–308.
- Eto, S.F., Claudiano, G.S., Fernandes, D.C., Marcusso, P.F, Silva, V.D., Menezes, T.F., e Salvador, S.R. 2013. Biologia do sistema imune dos teleósteos. *Revista Científica da Faculdade de Dom Bosco* 1: 22.
- FAO. 2018. The state of world fisheries and aquaculture-Meeting the sustainable Development goals. Roma, Itália.
- Ferreira, M.G.R., e Gonçalves, E.P. 2007. Tipo de estacas e crescimento de cipó-alho (*Mansoa alliacea*) (Lam.) A. Gentry. Circular técnica 98. Porto velho, Rondônia, Brasil.
- Ferreira, P.M.F., Nascimento, L.S., Dias, Moreira, D.C.D.M.V., Salaro, A.L., e Freitas, M.B.D. 2014. Essential oreganum oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. *Journal of the World Aquaculture Society* 45: 28-33.
- Fernandez, A.B., Blas, I., e Ruiz, I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista Aquatic* 18: 33-38.

- Fijan, N. 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *Journal of Fish Biology* 60: 999-1014.
- Fu, G.H., Bai, Z.Y., Xia, J.H., Liu, F., e Liu, P. 2013. Analysis of two Lysozyme genes and antimicrobial functions of their recombinant proteins in Asian seabass. *Plos ONE* 8: 79743. doi:10.1371/journal.pone.0079743
- Gaines, A.P.L., Lozano, L.E.S., Viana, G.M., Monteiro, P.C., e Araujo, C.S.O. 2012. Tissue changes in the gut of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), infected by the nematode *Spirocamallanus inopinatus* (Travassos, 1929). *Neotropical Helminthology* 6: 147–157.
- Garcia, F., Schalch, S.H.C., Onaka, E.M., Fonseca, F.S., e Batista, M.P. 2012. Hematologia de Tilápia-do-nilo alimentada com suplemento à base de algas frente a desafios de estresse agudo e crônico. *Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e zootecnia* 64: 198-204.
- Giri, S.S., Suda, S., Jai, V., Sukumaran, e V. Park, S.C. 2016. Dietary emodin affects the growth performance, immune responses, and disease resistance of *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture International* 24: 85–99.
- Gopalakannan, A., e Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* 255: 179-187.
- Guselle, N. J., Markham, R. J. F. e Speare, D.J. 2006. Intraperitoneal administration of b-1,3/1,6-glucan to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), protects against *Loma salmonae*. *Journal of Fish Diseases* 29: 375–381.
- Haghighi, M., e Rohani. S. 2013. The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Medicinal Plant and Herbal Therapy Research* 1: 8-12.
- Hansen, J.D., Landis, E.D., e Phillips, R.B. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *National Academy of Sciences* 102: 6919–6924.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., e Heo, M.S. 2011b. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317: 1–15.
- Harikrishnan, R., Heo, M.S., Balasundaram, C., Kim, J.S., e Han, Y.J. 2010. Effect of *Punica granatum* solvent extracts on immune system and disease resistance in *Paralichthys olivaceus* against lymphocystis disease virus (LDV). *Fish e Shellfish Immunology* 29: 668 - 673.

- Harikrishnan, R., Kim, M.C., Kim, J.S., Balasundaram, C., Heo, M.S. 2011a. Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive flounder. *Fish e Shellfish Immunology* 30: 964-97.
- Harikrishnan, R., Nisha, R.M, e Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221: 41–50.
- Hazen, T.C., Fliermans, C.B., Hirsch, R. P., e Esch, G.W. 1978. Prevalence and Distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 731-738.
- Hikima, J., Hirono, I., e Aoki, T. 1997. Characterisation ond expression of c-type lysozyme from Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 6: 339-344.
- Hoseinifar, S.H., Khodadadian, H.Z., Miandare, H.K., Doan, H.V., Romano, N., e Dadar, M. 2017. Enrichment of common carp (*Cyprinus carpio*) diet with medlar (*Mespilus germanica*) leaf extract: effects on skin mucosal immunity and growth performance. *Fish e Shellfish Immunology* 67 346–352.
- Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., e Merrifield, D.L. 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture* 318: 90–94.
- Hoshino, M.D.F.G., Marinho, R.G.B., Pereira, D.F., Yoshioka, E.T.O., Tavares-Dias, M., Ozorio, R.O.A., Rodriguez, A.F.R., Ribeiro, R.A., e Faria, F.S.E.D.V. 2017. Hematological and biochemical responses of pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae) fed with diets containing a glucomannan product derived from yeast and algae. *Acta amazonica* 47: 87 – 94.
- Huttenhuis, H.B.T., Ribeiro, A.S.P., Bowden, T.J., Van Bavel, C., Taverne-Thiele, A.J., e Rombout, J.H.W.M. 2006. The effect of oral immunostimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) *Fish e Shellfish Immunology* 21: 261-271.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da pecuária Municipal. GEPEC/COAGRO, Rio de Janeiro, 2018.
- Imbiriba, E.P. 2001. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em Cativeiro. *Acta Amazonica* 31: 299-316.
- Inoue, B.L.A., Maciel, K.A.P.O., Affonso, E.G., Boijink, C.L., e Tavares-Dias, M. 2016. Growth, parasitic infection and hematology in *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fed diets containing *Allium sativum*. *Journal of Applied Ichthyology* 32: 901–905.

- Iwama, G.K., Morgan, J.D., e Barton, B.A. 1995. Simple field methods for monitoring stress and general condition of fish. *Aquaculture Research* 26: 273-282.
- Jaafar, R.M., Skov, J., Kania, P.W., e Buchmann, K. 2011. Dose Dependent Effects of Dietary Immunostimulants on rainbow trout immune parameters and susceptibility to the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Aquaculture Research e Development*. S3:001. doi:10.4172/2155-9546.S3-001: 1-8.
- Kanani, H. G., Nobahar, Z., Kakoolaki, S., Jafarian, H. 2014. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and imune responses in juvenile *Huso huso*. *Fish Physiol Biochem* 40:481–490.
- Kiseleva, M., Balabanova, L., Elyakova, L., Rasskazov, V., e Zvyagintseva, T. 2014. Effect of treatment of chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum) eggs with 1,3; 1,6-β-D-glucans on their development and susceptibility to Saprolegnia infection. *Journal of Fish Diseases* 37: 3–10.
- Kumar, I.V., Chelladurai, G., Veni, T. S., Peeran, S. H., e Mohanraj, J. 2014. Medicinal plants as immunostimulants for health management in Indian cat fish. *Journal of Coastal Life Medicine* 2: 426-430
- Lara-Flores, M., Olvera-Novo, M.A., Guzman-Méndez, B.E., e Lopez-Madrid, W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 16: 193-201.
- Lauridsen, J. e Buchmann, K. 2010. Effects of short and long term glucan feeding of rainbow trout (salmonidae) on the susceptibility to *Ichthyophthirius multifiliis* infections. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 40: 61–66.
- Lee, J.Y., e Gao, Y. 2012. Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 43: 447-458.
- Leonhardt, J.H., Leonhardt, C.M.R. Cericato, e L., Zanolo, R. 2011. O efeito de alginatos incorporados à ração sobre o desempenho produtivo e manejo de juvenis de tilápia do Nilo. *Semina: Ciências Agrárias* 32: 771-780.
- Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A., e Froysadal, E. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* 6:1-5.
- Lima, L.C., Ribeiro, L. P., Leite, R. C., e Melo, D.C. 2006. Estresse em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 30: 113-117.

- Lima, A.F., Rodrigues, A.P.; Lima, L.K.F., Maciel, P.O., Rezende, F.P., Freitas L.E.L., Tavares-Dias, M.; Bezerra, T.A. Alevinagem, recria e engorda do pirarucu, Brasília, DF, Embrapa, (2017).
- Lindsay, G. J. H. 1986. The significance of chitinolytic en-zymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence. *Aquaculture* 51: 169-173.
- Moghanlou, K.S., Isfahani, E.N., Dorafshan, S., Tukmechi, A.,Aramli, M.S. 2018. Effects of dietary supplementation with *Stachys lavandulifolia* Vahl extract on growth performance, hemato-biochemical and innate immunity parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology* 237 98–105.
- Magnadóttir, B. 2010. Immunological control of Fish Diseases. *Mar Biotechnol* 12: 361–379.
- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish e Shellfish immunology* 20: 123-151.
- Magnadóttir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjornsson, B., Jorgensen, T.O., e Pilstrom, L. 1999. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). II. The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122: 181–188.
- Mahdavi, M., Hajimoradloo, A. e Ghorban, R. 2013. Effect of *Aloe vera* Extract on Growth Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *World Journal of Medical Sciences* 1: 55-60.
- Manoppo, H., Manurung, U.N., e Tumbol, R.A. 2015. Efficacy of baker's yeast as immunostimulant in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of ChemTech Research* 8: 1396-1402.
- Manurung, U.N., Manoppo, H., e Tumbol, R.A. 2013. Evaluasi ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) sebagai imunostimulan dalam meningkatkan respon imun non-specific dan pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis Niloticus*). *Journal Budidaya Perairan* 1: 8-14.
- Marinho, R.G.B. 2013. Condição de saúde de pirarucus *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) cultivados em Macapá, Estado do Amapá. Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical. Macapá, Amapá, Brasil.
- Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Amaral, G.V., Vieira, F.N., Dotta, G., Bezerra, A.J.M., Pedrotti, F.S., Jerônimo, G.T., Buglione-Neto, C.C., e Pereira-Jr, G. 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* 68: 631-637.
- Matos, L.B., Cavero, B.A.S., Guimarães, S.F., e Affonso E.G. 2003. Influência da dieta com vitamina c e vitamina c+e nas respostas fisiológicas do pirarucu, *Arapaima gigas*,

- submetido à criação em tanques-redes. XII Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPN/CNPq Manaus-AM.
- Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. 2013 Censo aquícola nacional ano 2008. Brasília, Brasil.
- Miranda, L.H., Marchiori, N., Alfaro, C.R., e Martins, M.I. 2012. First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from *Arapaima gigas* cultivated in Peru. *Acta Amazonica* 42: 433 – 438.
- Mohamad, S., e Abasali, H. 2010. Effect of Plant Extracts Supplemented Diets on Immunity and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Agricultural Journal* 5: 199-127.
- Muthu, R., Pavaraj, M., Balasubramanian, V., e Rajan, M.K. 2015. Haematological studies on disease induced common Carp, *Cyprinus carpio* fed with formulated feed with plant extract of *Andrographis paniculata*. *World Journal of Zoology* 10: 9-12.
- Nya, E.J., Austin, B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32 963–970.
- Oliveira, E.G., Pinheiro, A.B., Oliveira, V.Q., Silva Júnior, A.R.M., Moraes, M.G., Branco Rocha, Í.R.C.B., Sousa, R. R., Costa, F.H.F. 2012. Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in cages. *Aquaculture* 370-371: 96–101.
- Oliveira, S.R., Souza, R.T.Y.B., Brasil, E.M., Andrade, J.I.A., Nunes É.S.S., Ono, E.A., e Affonso, E.G. 2011. LD<sub>50</sub> of the bactéria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Amazonica* 41: 321–326.
- Olivera-Condori, M., Flores-Arizaca, J., Vásquez-Zavaleta, T., e Ocsa-Borda, E. 2013. Propiedades fisicoquímicas y bioactivas *in vitro* del aceite esencial de *Mansoa alliacea* (Lam.) A. Gentry. *El Ceprosimad.* 2: 96-102.
- Pachanawan, A., Phumkhachorn, P., e Rattanachaikunsopon, P. 2008. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106: 419–424.
- Pádua, S.B., Menezes-Filho, R.N., Belo, M.A.A., e Nagata, M.M. 2014. A nutritional additive increases survival and reduces parasitism in Nile tilapia during masculinization. *Aqua Culture* 10: 24-27.



- Pádua, S.B., Martins, M.L., Menezes-Filho, R.N. e Nagata, M.M. 2015. Uso de AquateFish™ durante a formação de juvenis de tilápia: aumento da resistência contra doenças, melhoria na integridade intestinal e no desempenho produtivo. *Revista AquaFeed* 1:4-8.
- Pavanelli, G.C., Eiras, J.C. e Takemoto, R.M. 2010. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento 3ª Ed., UEM, Maringá, Paraná, Brasil.
- Pieters, N., Brunt, J., Austin, B., e Lyndon, A.R. 2008. Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 105: 723–732.
- Plumb, J.A., Larry A., e Hanson, L.A., 2011. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. 3<sup>th</sup>. Blackwell Publishing Ltd., Iowa, De Moines.
- Proietti Junior, A. A., Lima, L.S., Cardoso, F.M.N., Rodrigues, D.P., e Tavares-Dias, M. 2017. Bacterioses em alevinos de pirarucu de cultivo, com ênfase em edwardsielose e aeromonose. Comunicado técnico 149, Embrapa, Amapá, Brasil.
- Pooramini, M., Kamali, A., Hajimoradloo, A., Alizadeh, M., e Ghorbani, R. 2009. Effect of using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as probiotic on growth parameters, survival and carcass quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry. *International Aquatic Research* 1: 39-44.
- Pourmoghim, H., Haghghi, M., e Rohani, M.S. 2015. Effect of Dietary inclusion of *Origanum vulgare* extract on nonspecific immune responses and Hematological Parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of Environment Pharmacology and Life Sciences* 4: 33-39.
- Ramos, C.A., Costa, O.T.F., Duncan, W.L.P., e Fernandes, M.N. 2018. Morphofunctional description of mucous cells in the gills of the Arapaimidae *Arapaima gigas* (Cuvier) during its development. *Journal of veterinary medicine* 47: 330–337.
- Ranjan, R., Prasad, K.P., Vani, T., e Kumar, R. 2014. Effect of dietary chitosan on haematology, innate immunity and disease resistance of Asian seabass *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture Research* 45: 983–993.
- Rao, Y.V., Das, B.K., Pradhan, J., e Chakrabarti, R. 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shelfish Immunology* 20: 263-273.
- Rattanachaikunsopon, P., e Phumkhachorn, P. 2009. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107: 579–582.

- Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., e Piyatiratitivorakul, S. 2008. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research* 39: 134-143.
- Rey, A., Verján, N. Ferguson, H.W., e Iregui, C. 2009. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record* 164: 493-499.
- Rubio-Godoya, M. 2010. Inmunología de los peces óseos. Revisión Teleost fish immunology. *Revista Mexicana de Ciências Pecuárias* 1:47-57.
- Ruenkoed, S., Wang, W. 2019. Cloning, characterization, antibacterial activity and expression of hamp in pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) after bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 499: 61–71.
- Rufchaie, R., e Hoseinifar, S. H. 2014. Effects of dietary commercial yeast glucan on innate immune response, hematological parameters, intestinal microbiota and growth performance of white fish (*Rutilus frisi*) fry. *Croatian Journal of Fisheries* 72: 156-163.
- Saad, T.T., e Atallah, S.T., 2015. *Aeromonas hydrophila* in cultured *Oreochromis niloticus* and its effect on economic return of fish farm production. *International Journal on Recent Trends in Life Science and Mathematics* 2: 2349-7955.
- Saavedra, M.J., Guedes-Novais, S., Alves, A., Rema, P., Tacão, M. Correia, A., e Martínez-Murcia, A. 2004. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Microbiology* 7: 207–211.
- Sahu, B.S., Das, B. K., Mishra, B. K., Pradhan, J., e Sarangi, N. 2007. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology* 23: 80–86.
- Samal, D., Babu, S., e Abraham, J. 2005. Effect of garlic (*Allium sativum*) extract on the growth and disease resistance of *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). *Indian Journal Fish* 52: 207-214.
- Samal, S.K. Das, B.K. e Pal, B.B. 2014. In vitro and In vivo virulence study of *Aeromonas hydrophila* isolated from fresh water fish. *International journal of current research* 11: 117-125.
- Samayanpaulraj, V., Velu, V., e Uthandakalaipandiyan, R. 2019. Determination of lethal dose of *Aeromonas hydrophila* Ah17 strain in snake head fish *Channa striata*. *Microbial Pathogenesis* 127: 7–11.

- Santos, G.M.E., e Santos, A.C.M. 2005. Sustentabilidade da pesca da Amazônia. Estudos Avançados 19: 165-182.
- Santos, Y., Bandín, I., Nieto, T.P., Barja, J.L, Toranzo, A.E, e Ellis, A. E. 1991. Cell-surface associated properties of fish pathogenic bacteria. Journal of Aquatic Animal Health 3: 297-301.
- Saurabh, S. e Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research 39: 223-239.
- Scapigliati, G., Chausson, F. Cooper, E.L, Scalia, D., e Mazzini, M. 1997. Qualitative and quantitative analysis of serum immunoglobulins of four Antarctic fish species. Polar Biology 18: 209–213.
- Schalch, S.H.C., e Garcia, F. Enfermidade de peixes. 2011. Páginas, 99-130 in L.M.S. Ayroza, editor. Piscicultura-Manual Técnico. Canti, São Paulo, Brasil.
- Schmitt, P., Wacyk, J., Morales-Lange, B., Rojas, V., Guzmán, F., Dixon, B., e Mercado, L. 2015. Immunomodulatory effect of cathelicidins in response to a  $\beta$ -glucan in intestinal epithelial cells from rainbow trout. Developmental and Comparative Immunology 51: 160–169.
- Scorvo Filho, J.D., Rojas, N.E.T., Silva, C.M., e Konoike, T. 2004. Criação de *Arapaima gigas* (Teleostei Osteoglossidae) em estufa e sistema fechado de circulação de água, no estado de São Paulo. Boletim do Instituto de Pesca 30: 161–170.
- SEBRAE - Serviço Brasileiro De Apoio Às Micros e Pequenas Empresas. 2010. Manual de boas práticas de produção de pirarucu em Cativeiro, projeto pirarucu da Amazônia. Porto Velho: ed. SEBRAE 2010: 1-40.
- Secombes, C.J. 1996. The Nonspecific Immune System: Celular Defesas Paginas 63- 105 In G. Iwama, T. Nakanishi. The Fish Immune System. London Academic Press. London, Inglaterra.
- Silva, A. L. F., Gomes, L.C., Chagas, e E.C. 2006. Efeito De Diferentes Níveis dietários de ácido ascórbico sobre o desempenho de pirarucu (*Arapaima gigas*, Cuvier 1829). Documento 50. Anais da II jornada de iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil.
- Silva, A.M., e Duncan, W.L.P. 2016. Aspectos biológicos, ecologia e fisiologia do pirarucu (*Arapaima gigas*): uma revisão da literatura. Scientia Amazônia 5: 31-46.
- Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., e Martins, M.L., 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x

- Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 43: 908–916.
- Sivagurunathan, A., e Innocent, B.X. 2014. Immunomodulatory Effect of Dietary Cinnamon in Growth and Haematology of Tilapia Challenged with *Pseudomonas Aeruginosa*. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* 3: 277-280.
- Soares, M.G.M., Costa, E.L., Siqueira-Souza, F.K., Anjos, H.D.B., Yamamoto, K.C., e Freitas, C.E.C. 2008. Peixes de lagos do médio Rio Solimões. 2ª edição. Instituto Piatam, Manaus, Brasil.
- Song, X., Zhao, J., Bo, J., Liu, Z., Wu, K., e Gong, C., 2014. *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): An experimental model. *Aquaculture* 434: 171–178.
- Stratev, D., Vashin, I., e Daskalov, H. 2014. Determination of beta-haemolytic activity and minimum inhibitory concentrations of antimicrobial drugs against *Aeromonas hydrophila* strains isolated from fish products. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine ONLINE FIRST*, online at <http://tru.uni-sz.bg/bjvm/bjvm.htm>: 1:9.
- Sujatha, M., Dhasarathan, P., Nivetha, A., e Kuberan, T. 2013. Pathogenicity of bacterial isolates to *Catla catla*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 12: 575-584.
- Tavares-Dias, M.e Moraes, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Tekedar H.C., Karsi, A., Akgul, A. Kalindamar, S., Waldbieser, G.C. Tad Sonstegard, e Steven G. Schroeder, Mark L. 2015. Lawrence Complete genome sequence of fish pathogen *Aeromonas hydrophila* AL06-06. *Genome Announcements* 3: Issue 2 e 00368-15.
- Tewary A., e Patra, B.C. 2011. Oral administration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth promoter and immunomodulator in *Labeo rohita* (Ham.). *Journal of Aquaculture Research and Development* 2: 1-7.
- Toazza, C., Carandina, L., Salvador, L., Loyola, W., e Freitas, J.C. 2013. ArtinM as a Neutrophil Immunostimulant in Juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Open Journal of Veterinary Medicine* 3: 204-208.
- Tort, L., Balasch, J.C., e Mackenzie, S. 2003. Fish immune system. Acrossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* 22: 277: 286.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., e Case, C.L. 2012. *Microbiologia* 10. ed. Artmed, Porto Alegre, Brasil.

- Tran, N.T. Gao, Z. X., Milton, J., Lin, L. Zhou, Y., e Wang, W.M. 2015. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* to blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* International Journal of Scientific and Research Publications 5: 1-7.
- Uchida, D., Hirose, H., Chang, P.K., Aranishi, F., Hirayabu, E., Mano, N., Mitsuya, T., Prayitno, S.B, e Natori, M. 2000. Characterization of Japanese el immunoglobulin M and its level in serum. Comparative Biochemistry and Physiology 127: 525–532.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., e Moran, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni Medicina 56: 486–503.
- Van Muiswinkel, W.B. 1995. The piscine immune system: innate and acquired immunity. Paginas 729:750 In Woo PTK. Fish Disease and Disorders. Cambridge, UK: CAB international.
- Van Muiswinkel, W.B. 2006. A history of fish immunology and vaccination I. The early days. Fish and Shellfish Immunology 25: 397–408.
- Vollstad, D., Bogwald, J., Serod, O.G., e Dalmo, R. A. 2006. Influence of high-M alginate on the growth and survival of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor Olafsen*) fry. Fish and Shellfish Immunology 20: 548-561.
- Wijendra, G.D.N.P. e Pathiratne, A. 2007. Evaluation of immune responses in an Indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with levamisole incorporated diet. Journal of Science of the University of Kelaniya Sri Lanka 3: 17-28.
- Wu, Z.Q., Jiang, C., Ling, F., e XueWang, G. 2015. Effects of dietary supplementation of intestinal autochthonous bacteria on the innate immunity and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture 438: 105–114.
- Xu, W., Gao, Z. Qi, Z., Qiu, M., Peng, J. Q., e Shao, R. 2014. Effect of dietary *Chlorella* on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelii*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 14: 53-57.
- Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H., e Cheng, W. 2008. Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology 25: 19-27.
- Yilmaz, S. e Ergun, S. 2012. Effects of garlic and ginger oils on hematological and biochemical variables of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Journal of Aquatic Animal Health 24: 219–224.
- Yousif, A.N., Albright, L.J., e Evelyn, T.P.T., 1991. Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Diseases of Aquatic Organisms 10: 45-49.

- Zhang, Y., Salinas, I., e Sunier, J.O. 2011. Recent findings on the structure and the function of teleost IgT. *Fish and Shellfish Immunology* 31: 627-634.
- Zhou, X., e Wang, Y., 2012. Probiotics in aquaculture – benefits to the health, technological applications and safety. *Health and Environment in Aquaculture* 24: 215-226.
- Zimmerman, A.M., Moustafa, F.M., Romanowski, K.E., e Steiner, L.A. 2011. Zebrafish immunoglobulin IgD: Unusual exon usage and quantitative expression profiles with IgM and IgZ/T heavy chain isotypes. *Molecular Immunology* 48: 15–16.
- Zoghbi, M.G.B., Oliveira, J., Skelding, G.M., Guilhon, P. The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19: 795-804.

## **CAPÍTULO 1**

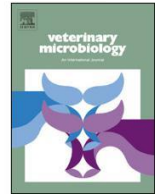
**Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas*  
(Arapaimidae), the giant fish from Amazon**

**Artigo publicado no periódico Veterinary Microbiology: 188: 12-15, 2016.**



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon



Marcia K.R. Dias<sup>a</sup>, Luciana S. Sampaio<sup>b</sup>, Aldo A. Proietti-Junior<sup>b</sup>, Eliane T.O. Yoshioka<sup>a,c</sup>,  
Dália P. Rodrigues<sup>d</sup>, Anselmo F.R. Rodriguez<sup>e</sup>, Ricardo A. Ribeiro<sup>e</sup>, Fernando S.E.D.V. Faria<sup>e</sup>,  
Rodrigo O.A. Ozório<sup>f,g</sup>, Marcos Tavares-Dias<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Macapá (UNIFAP), AP, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brazil, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Enterobactérias, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal do Acre (UFAC), AC, Brazil

<sup>f</sup> Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), Porto, Portugal

<sup>g</sup> Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2015

Received in revised form 31 March

2016 Accepted 1 April 2016

#### Keywords:

*Aeromonas hydrophila*

Bacteria

Infection

Tolerance limit

Pirarucu

### ABSTRACT

*Aeromonas hydrophila* is causing substantial economic losses in world aquaculture. This study determined the tolerance limit (LD<sub>50-96h</sub>) of *A. hydrophila* in *Arapaima gigas*, and also investigated the clinical signs after intradermal inoculation. *Arapaima gigas* fingerlings were inoculated intraperitoneally with 0 (control), 1.0 10<sup>5</sup>, 1.0 10<sup>6</sup>, 1.0 10<sup>7</sup>, 1.0 10<sup>9</sup> and 1.0 10<sup>10</sup> CFU/mL of *A. hydrophila* for the determination of LD<sub>50-96h</sub>, which was 1.8 10<sup>8</sup> CFU/mL. In another trial with intradermal inoculation of 1.8 10<sup>8</sup> CFU/mL *A. hydrophila*, there was a 91.6% of mortality between 8 and 23 h, and several clinical signs were found. As follows: depigmentation in the tegument, lesions in the tail and fins, loss of balance, reduction of respiratory movements, hemorrhagic foci, necrotic hemorrhages in the kidney, liver and swim bladder, splenomegaly, ascites in the abdominal cavity and hyperemia, enlargement of the gall bladder, among other clinical signs observed. The results showed that *A. gigas* has a relative tolerance to *A. hydrophila* when compared to other Neotropical fish species.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Aquaculture strives to produce large quantities of fish in biological and economically efficient way, but infectious diseases are one of the major limiting factors for production (Plumb et al., 2011; Silva et al., 2012; Marinho et al., 2013) and productivity. Therefore, disease prevention is of extreme importance to the aquaculture industry of fish as the *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (pirarucu). This Arapaimidae species is known as the giant fish from Amazon because it can measure up to 3 m in length. This has good tolerance to the high densities of storage and its robustness in handling (Cavero et al., 2003; Araújo et al., 2009; Marinho et al., 2013). However, during the early stages of *A. gigas* culture, it encounters many problems with bacterial diseases which often cause high economic losses for fish farming due to high mortality rates.

*Aeromonas hydrophila* is an aquatic bacterium that can be isolated in estuarine waters, marine and freshwater, as well as in the intestinal tract of farmed fishes (Lallier and Higgins, 1988; Aoki, 1999; Janda and Abbott, 2010). This pathogen causes ulcerations, haemorrhagic focus, epizootic ulcerative syndrome, and erosion of the fins in farmed and wild fish. Its pathogenicity is mediated by different extracellular proteins such as aerolysin, lipase, chitinase, amylase, gelatinase, hemolysins, enterotoxins in addition to type III secretion system (TTSS); a specialized protein, whose role is to export virulence factors directly into the host cells, subverting the normal functions of the host for the benefit of invasive bacteria. The ADP-ribosylating toxin that leads to the interruption of the NF-κB pathway, cytoskeleton damage and apoptosis are characterized in *A. hydrophila* (Aoki, 1999; Janda and Abbott, 2010; Plumb et al., 2011; Carraschi et al., 2012; Doan, 2013; Silva et al., 2012; Song et al., 2014; Stratev and Vashin, 2014).

It has recognized that *A. hydrophila* is a pathogenic agent not only for fish, amphibians, reptiles, but also for different species of mammals including man (Lallier and Higgins, 1988; Aoki, 1999; Janda and Abbott, 2010; Plumb et al., 2011). In fishes, many

\* Corresponding author at: Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, 2600, 68903-419, Macapá, AP, Brazil.  
E-mail address: [marcos.tavares@embrapa.br](mailto:marcos.tavares@embrapa.br) (M. Tavares-Dias).



infectious diseases display chronic characteristics that include clinical signs that persist for weeks, during which time the mortality rate increases gradually and the cumulative mortality can be high (Plumb et al., 2011).

The bacteriosis is dependent on the number of bacteria, whose concentration is variable according to the species infected and factors such as virulence, route of inoculation and temperature (Plumb et al., 2011; Carraschi et al., 2012; Song et al., 2014). Studies of experimental infection are necessary for each species, allowing the development of protocols for the prophylaxis and treatment that are more efficient against dangerous pathogen for fish farming. The objective of the current study was to determine the tolerance limit (LD<sub>50-96h</sub>) of *A. hydrophila* to *A. gigas*, and the clinical signs after intradermal inoculation of the lethal concentration, to be applied in challenge tests.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fish and acclimatization

The fingerlings of *A. gigas* (38.8 7.1 g and 29.6 7.9 cm) were purchased from a commercial fish farm and were acclimated in the Laboratory of Aquaculture and Fisheries, Embrapa Amapá, Macapá (Brazil) in tanks of 1000 L of water. During the nursery, fish were fed with extruded feed containing 45% crude protein (CP) and, subsequently with extruded ration containing 40% CP.

### 2.2. *Aeromonas hydrophila* and preparation of the culture medium

*A. hydrophila* (American Type Culture Collection 7966 (ATCC 7966) was obtained at the National Reference Laboratory for Bacterial Enteroinfections (LABENT) of the Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Rio de Janeiro (Brazil), belonging to the Collection of Bacterial Enteropathogens and maintained in cryopreservation.

The liquid culture medium Brain Heart Infusion (BHI – Fluka Analytical – Sigma Aldrich™, St. Louis, MO, USA) was prepared according to the instructions of the manufacturer by dissolving 37 g in 1 L of distilled water. The sterilization was processed by autoclaving at 121 C for 15 min (Phoenix<sup>1</sup> AV 75, SP, Brazil). The GSP cultivation agar medium (GSP Agar – Fluka Analytical – Sigma Aldrich™, St. Louis, MO, USA) was prepared according to the manufacturer's instructions by dissolving 45 g in 1 L of distilled water and sterilized by autoclave at 121 C for 15 min. After removal and cooling between 45 and 50 C, 100,000 International Units of Penicillin G per liter (UI/L) were added followed by homogenization and distribution in 90 mm sterile disposable Petri dishes.

### 2.3. Preparation of *A. hydrophila* suspensions

Bacterial suspensions were prepared by transferring a heave containing three to five colonies of *A. hydrophila* isolated in Petri dishes containing the GSP agar medium after 24 h of cultivation at 35 C to Falcon tubes containing 10 mL of BHI broth and reincubated for 18 h in a bacteriological incubator (Olidex<sup>1</sup> CZ-ECB1 Linea, SP, Brazil).

After incubation of the bacterial suspensions with the culture, logarithmic growth phase was measured by turbidity caused by bacterial growth; densitometer Densichek™ (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) was designed to measure the optical density of a suspension of microorganisms. The values were processed in nephelometric units of McFarland and adjusted to the respective concentrations of the number of tubes from 0.5 to 7 of that scale. To obtain concentrations exceeding the reading capacity of Densichek™, bacterial inocula were adjusted and subsequently, suspensions from 10 mL were centrifuged at 1000 g for five

minutes for the formation of pellet with ten times concentration. Once standardized bacterial concentrations and, respected the interval of up to 15 min after adjustment, fish were inoculated with the bacterial suspension.

### 2.4. Lethal dose (LD<sub>50-96h</sub>) of *A. hydrophila* to *A. gigas*

Ninety specimens of *A. gigas* (353 110 g and 39 27 cm) were distributed in six tanks of 100 L (n = 15 fish/tank), and maintained in fasting during the 96 h previously to the LD<sub>50</sub> trial. Fish were inoculated intraperitoneally with 1.0 mL of *A. hydrophila* suspension with the following concentrations of the bacterium: 0CFU/mL (control using 1.0 mL of NaCl 0.85%), 3.0 10<sup>5</sup> CFU/mL, 3.0 10<sup>6</sup> CFU/mL, 3.0 10<sup>7</sup> CFU/mL, 1.0 10<sup>9</sup> CFU/mL and 1.0 10<sup>10</sup> CFU/mL. The LD<sub>50-96h</sub> was estimated using the Spearman-Kärber method (Hamilton et al., 1977).

This study was conducted in accordance with the principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Committee on Animal use (CEUA/UFAC: 08/2014).

### 2.5. Intradermal inoculation of *A. hydrophila* in *A. gigas*

Fingerlings of *A. gigas* (320 120 g and 38 28 cm) were acclimated for three days in aquaria of 100 L of water and kept under constant aeration, for intradermal inoculation of *A. hydrophila* in the region of the caudal peduncle exactly on the lateral line. The bacterial suspension was adjusted to 1.0 10<sup>8</sup> CFU/mL and, once standardized as previously described, and observing the range for up to 15 min after adjustment, fishes were inoculated. Fishes were divided into two treatments, 0 CFU/mL (inoculated control with 0.5 mL of NaCl solution 0.85%) and 0.5 mL of the bacterium suspension of 1.0 10<sup>8</sup> CFU/mL and three repetitions each, were inoculated with the bacterial suspension intradermal, to investigate for clinical signs of bacteriosis. The inoculation of fish in the control group preceded those of the group that received the inoculation of *A. hydrophila* to avoid possible cross-contamination. Observations were made of behavioral changes, morbidity and mortality of the fish after inoculation for a period of 24 h.

### 2.6. The water quality in the assays with *hydrophila*

During the assays, the static water system and constant sandblasting was used. On a daily basis, a portion of the volume of water tanks and aquariums was changed. The levels of dissolved oxygen (6.0 0.1), temperature (27.6 0.7 C), pH (7.2 0.8), were measured daily, using multi-parametric probe (Hanna, mod. HI 96715<sup>@</sup>) and the levels of total ammonia (4.9 2.9 mg/L) and nitrite (0.03 0.03 mg/L) were measured using digital apparatus Hanna, mod. HI 96715.

## 3. Results

Mortality was not observed after 96 h of inoculation with 1.0 10<sup>5</sup> and 1.0 10<sup>5</sup> CFU/mL of *A. hydrophila*. However, first mortalities occurred in 46.6% of fish inoculated with 1.0 10<sup>9</sup> and in 73.3% of fish inoculated with 1.0 10<sup>10</sup> CFU/mL (Table 1).

Table 1  
Mortality of *Arapaima gigas* during the DL<sub>50-96h</sub> of *Aeromonas hydrophila*.

Pathogen concentration (UFC/mL)	24 h	48 h	72 h	96 h	%
0	0	0	0	0	0
1.0 10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0
1.0 10 <sup>6</sup>	0	1	0	0	6.6
1.0 10 <sup>9</sup>	0	3	0	0	20.0
1.0 10 <sup>10</sup>	12	0	0	0	80.0
1.0 10 <sup>10</sup>	13	0	0	0	86.0

In the current rearing conditions, it was determined that for *A. gigas* the lethal dose (LD<sub>50-96h</sub>) of *A. hydrophila* was  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL. After inoculation with *A. hydrophila* and the report of fish mortality, hemorrhagic signs were observed during necropsy, probably caused by septicemia.

After intradermal inoculation with  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL of *A. hydrophila*, there was 91.6% mortality between 8 and 23 h. In addition, fish showed alterations in behavior, which was not observed in control animals. In the tegument of *A. gigas*, macroscopic lesions such as reddish edges were observed at site of inoculation with *A. hydrophila*, but these lesions varied in form, length and size. The depigmentation along the tegument and lesions in the tail and fins were observed under various sizes and shapes. Large prominent projections were observed in the inoculation site of *A. hydrophila*. These lesions were filled with transparent to slightly turbid liquid, and in some cases, a slight dripping of blood that invariably caused the detachment of the skin in areas adjacent to the inoculation site. Fish had anorexia, loss of balance with erratic movement, reduction of respiratory movements, abnormal coloration along the body with hemorrhagic foci, abrasion of the dorsal fin, irregular lesions that left the muscles exposed in ventral and anal-fin rays, necrotic hemorrhages of internal organs such as kidney, liver and its modified swim bladder and splenomegaly were the signs which preceded the death of the fish after intradermal inoculation with *A. hydrophila*, besides ascites containing mucosal yellowish fluid, deposition of bloody fluid in the abdominal cavity, hyperemia, increased gall bladder, abdominal cavity with the swollen wall of its modified swim bladder, small areas of bleeding in the liver (Fig. 1) and humidity were found along these internal organs. These changes were observed in those fish inoculated with *A. hydrophila*, but did not

occur in control fish inoculated with sterile saline solution (Fig. 1A).

In the transverse cross section of the fish inoculated with *A. hydrophila*, it was observed that the muscles had reduced its consistency and an extensive hemorrhagic area in the region inoculated with the bacterium.

#### 4. Discussion

In recent years, world aquaculture has grown rapidly in terms of production, but intensive and stressful rearing conditions makes farmed fish highly susceptible to different infectious diseases, which are now the most serious problem for the aquaculture industry, causing heavy economic losses. Consequently, the intensive aquaculture have increased both the occurrence and severity of infections by *Aeromonas* spp., emerging as one of the main causes of high mortality in rearing freshwater fish (Plumb et al., 2011; Silva et al., 2012; Doan, 2013; Song et al., 2014), due to increased environmental stress (Plumb et al., 2011). Thus, in the fish farm, monitoring of environmental quality is essential (Marinho et al., 2013; Doan, 2013). In the assay of inoculation with *A. hydrophila* in *A. gigas*, water quality remained constant and was within the limits considered suitable for Amazonian fish (Araújo et al., 2009; Marinho et al., 2013). However, in *Carassius auratus* inoculated with *A. hydrophila* the water temperature affected the structure of the cellular membrane of this bacterium, resulting in differences in the mortality of the fish (Rahman et al., 2011), influencing thus the survival rates of fish.

In diseased fish, the clinical signs of aeromoniosis caused by *A. hydrophila* indicate that this primary pathogen, presents great economic importance to the freshwater fish farming (Silva et al., 2012). *Aeromonas* spp. can attack the fin, tegument and abdominal cavity, and may be able to break the blood vessels, resulting in

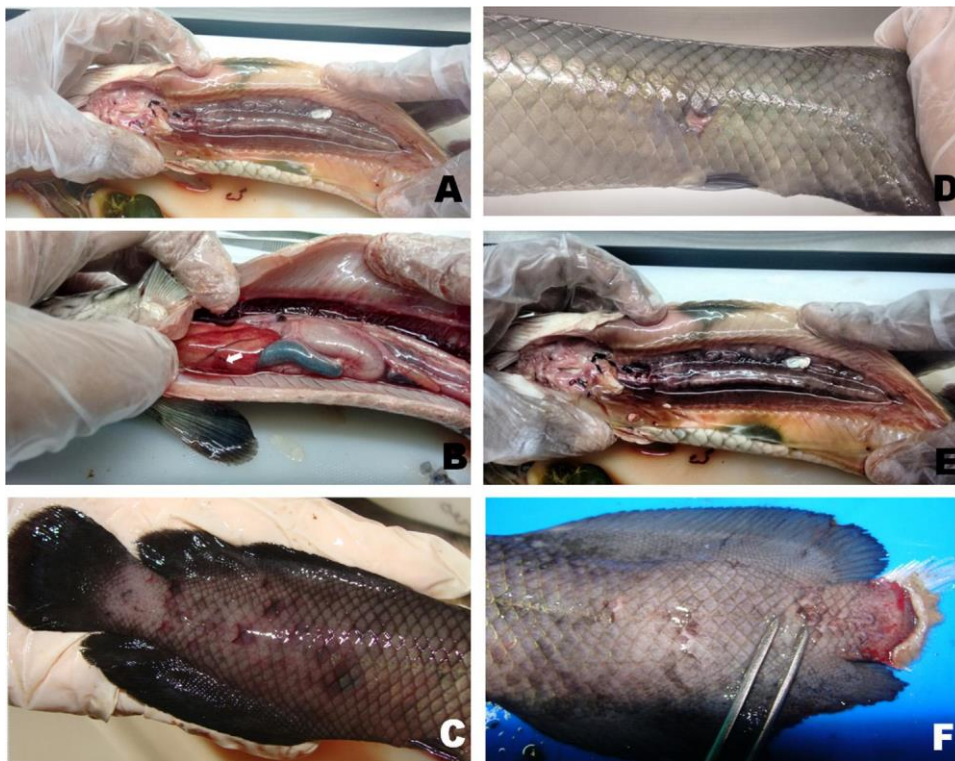


Fig. 1. Clinical signs in *Arapaima gigas* intradermal inoculated with *Aeromonas hydrophila*. (A) Viscera of control fish inoculated with saline solution. (B) Congestion, hyperemia and lesion (arrow) in liver of fish inoculated with *Aeromonas hydrophila*. (C) Integumentary injuries with depigmentation and hemorrhagic foci. (D) Lesion at the site of *Aeromonas hydrophila* inoculation. (E) Deposition of bloody fluid in the abdominal cavity, and hyperemia and edema of the swim bladder. (F) Injury on caudal fin with hemorrhagic foci.

ulcerative lesions with a hemorrhagic appearance throughout the tegument (Silva et al., 2012; Doan, 2013).

In this study, *A. gigas* inoculated intraperitoneally with different concentrations of *A. hydrophila* only showed signs of hemorrhage in this cavity. The mortality of *A. gigas* occurred within 12 h after the beginning of inoculation. Toxins and extracellular enzymes, together with some structural characteristics of this bacterium, are considered important factors in the virulence of *A. hydrophila* (Aoki, 1999; Plumb et al., 2011; Silva et al., 2012; Stratev and Vashin, 2014), the bacterium that produces toxins (cholinesterase, aerolysin, **a** and **b** hemolysins, enterotoxins, proteases, haema-glutinins, adhesins etc) are lethal to fish when in high quantity (Aoki, 1999; Boijink and Brandão, 2001; Silva et al., 2012).

The lethal concentration of *A. hydrophila* for *A. gigas*, was  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL, similar concentration to that described for *Pangasius bocourti*,  $2.2 \times 10^8$  CFU/mL (Doan, 2013). In contrast, it was lower when compared to reported lethal concentration for *Brycon amazonicus*, which was  $6.6 \times 10^{11}$  CFU/mL and early mortality occurred only after 57 h of the beginning of intraperitoneal cavity inoculation (Oliveira et al., 2011). Studies performed in *Labeo rohita* showed that concentrations of  $2.2 \times 10^7$ ,  $2.2 \times 10^8$  and  $2.2 \times 10^9$  CFU/mL of *A. hydrophila* caused 100% mortality in 24 h after intraperitoneal inoculation, but early mortality occurred after 3 h from the beginning of the bacterial inoculation (Bharadwaj et al., 2013). However, as the mortality caused by *A. hydrophila* is also dependent on the concentration of bacteria, virulence factor (production of extracellular product) temperature, fish size and the type of bacteria strain used, the onset of clinical signs and pathogenicity vary between the fish species (Plumb et al., 2011; Carraschi et al., 2012; Silva et al., 2012; Doan, 2013; Song et al., 2014). Therefore, our results show that *A. gigas* exhibits high tolerance to *A. hydrophila* when compared to other Neotropical freshwater fish.

In *A. gigas*, loss of balance, erratic movement and reduction of slower respiratory movements were the signs preceding the death of the fish after intradermal inoculation of *A. hydrophila*. Such manifestations were also described for *Rhamdia quelen* intramuscularly inoculated with *A. hydrophila* (Boijink and Brandão, 2001), as well as for *Oreochromis niloticus* inoculated intraperitoneally (Eissa et al., 2009) and *B. amazonicus* (Oliveira et al., 2011), due to the presence of acetylcholinesterase, which exhibits narcotic effect by acting on the central nervous system of fish (Boijink and Brandão, 2001). However, due to the time period between the inoculation of *A. gigas* and its death, crateriform boils were not observed in these animals inoculated, maybe because of the small course of the pathological process. Many chronic infectious diseases in fish have characteristics which include maximum clinical signs that persist for weeks, during which the mortality rate increases gradually and cumulative mortality can be high (Aoki, 1999; Plumb et al., 2011; Song et al., 2014). In the post-mortem inspection of fish in this study, when intradermal inoculated with *A. hydrophila*, there have been various clinical signs consistent with this bacteriosis, which have also been described for various fish species inoculated with varying concentrations of this same bacterium (Boijink and Brandão, 2001; Eissa et al., 2009; Carraschi et al., 2012; Silva et al., 2012; Oliveira et al., 2011; Doan, 2013; Stratev and Vashin, 2014). Therefore, all findings in this study provide important information not only on the pathogenesis of *A. hydrophila*, but also for the development of treatment strategies for the control of this bacteriosis.

In summary, although the infected fish with lower concentrations of *A. hydrophila* showed no clinical signs and mortality,

environmental changes, improper management and parasitic infections are relevant factors that may cause outbreaks of bacterial diseases. Therefore, additional studies should be conducted in the search for improvements in immunological resistance of *A. gigas* against the pathogenicity of *A. hydrophila*.

## Acknowledgements

This study was supported by Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), through the project Pro-Amazônia (#230238.00754/2013-61) and the PhD grant to first author. This study was also supported by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) by productivity grants for M. Tavares-Dias.

## References

- Aoki, T., 1999. Motile aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: Woo, P.T.K., Bruno, D. W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CABI Publishing, London, pp. 427–453.
- Araújo, C.S.O., Gomes, A.L., Tavares-Dias, M., Andrade, S.M.S., Belém-Costa, A., Borges, J.T., Queiroz, M.N., Barbosa, M., 2009. Parasitic Infection in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimatidae) kept in semi-intensive fish farm in central Amazon, Brazil. *Vet. Arhiv.* 79, 499–507.
- Bharadwaj, A., Abraham, T.J., Joardar, S.N., 2013. Immune effector activities in challenged rohu, *Labeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas bacterin*. *Aquaculture* 16, 392–395.
- Boijink, C.L., Brandão, D.A., 2001. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis e Jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciênc. Rural* 31, 503–507.
- Carraschi, S.P., Cruz, C., Neto, J.G.M., Moraes, F.R., Rossi Júnior, O.D., Nader Neto, A., Bortoluzzi, N.L., 2012. Evaluation of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887). *Int. J. Fish. Aquac.* 4, 81–84.
- Cavero, B.A.S., Pereira-Filho, M., Roubach, R., Ituassú, D.R., Gandra, A.L., Crescêncio, R., 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. *Pesq. Agropec. Brasil* 38, 103–107.
- Doan, H.V., 2013. The LD50 of Asian catfish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1870) challenge to pathogen *Aeromonas hydrophila* FW52 strain. *Pen. J.* 75, 287–293.
- Eissa, I.A.M., Badran, A.F., Abd-Elmoez, A.M., 2009. Dietary sodium alginate as an immunostimulant in cultured *Oreochromis niloticus* and its resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Suez Canal Vet. Med. J.* 14, 19–32.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714–719.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*, taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 35–73.
- Lallier, R., Higgins, R., 1988. Biochemical and toxigenic characteristics of *Aeromonas* spp. isolated from diseased Mammals, moribund and healthy fish. *Vet. Microbiol.* 18, 63–71.
- Marinho, R.G.B., Tavares-Dias, M., Dias-Grigório, M.K.R., Neves, L.R., Yoshioka, E.T.O., Boijink, C.L., Takemoto, R.M., 2013. Helminthes and protozoan of farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite relationship. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 65, 1192–1202.
- Oliveira, S.R., Souza, R.T.Y.B., Brasil, E.M., Andrade, J.I.A., Nunes, E.S.S., Ono, E.A., Affonso, E.G., 2011. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to *matrinxã*, *Brycon amazonicus*. *Acta Amaz.* 41, 321–326.
- Plumb, J.A., Larry, A., Hanson, L.A., 2011. *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*, 3th edition Blackwell Publishing Ltd., Iowa, pp. 492.
- Rahman, M.H., Suzuki, S., Kawai, K., 2011. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish *Carassius auratus*. *J. Appl. Ichthyol.* 17, 282–285.
- Silva, B.C., Mourão, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L., 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult. Res.* 43, 908–916.
- Song, X., Zhao, J., Bo, J., Liu, Z., Wu, K., Gong, C., 2014. *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp *Ctenopharyngodon idella*: an experimental model. *Aquaculture* 434, 171–178.
- Stratev, D., Vashin, I., 2014. *Aeromonas hydrophila* sensitivity to disinfectants. *Sci.* 8, 324–330.

## CAPÍTULO 2

Growth, physiological and immune responses of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) to *Aeromonas hydrophila* challenge and handling stress following feeding with immunostimulant supplemented diets

**Artigo publicado no periódico Fish and Shellfish Immunology, 84: 843–847, 2019.**





## Full length article

## Growth, physiological and immune responses of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) to *Aeromonas hydrophila* challenge and handling stress following feeding with immunostimulant supplemented diets

Marcia Kelly Reis Dias<sup>a</sup>, Eliane Tie Oba Yoshioka<sup>b</sup>, Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez<sup>c</sup>, Ricardo Amaral Ribeiro<sup>c</sup>, Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana Faria<sup>c</sup>,

Rodrigo Otávio Almeida Ozório<sup>d,e</sup>, Marcos Tavares-Dias<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Tropical Biodiversity (PPGBio), Federal University of Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brazil

<sup>b</sup> Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brazil

<sup>c</sup> Postgraduate Program in Biotechnology and Biodiversity (Bionorte), Federal University of Acre (UFAC), AC, Brazil

<sup>d</sup> Interdisciplinary Center for Marine and Environmental Research (CIIMAR), Porto, Portugal

<sup>e</sup> Abel Salazar Institute of Biomedical Sciences (ICBAS), University of Porto, Porto, Portugal



## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Arapaima gigas*  
Bacteria  
Freshwater fish  
Immunostimulant  
*Saccharomyces cerevisiae*

## ABSTRACT

The current study tested the efficacy of a dietary immunostimulant additive (Aquate Fish™) on the growth performance, and on the physiological and immune responses of *Arapaima gigas*. Two trials were carried out: a feeding trial for 30 days with the experimental diets and a challenge trial for 7 days, in which fish were bacterial challenge (*Aeromonas hydrophila*) following by 60 s handling stress. During the feeding trial, fingerlings were fed diets supplemented with 0 (control), 6, 9 and 12 g Aquate Fish™/kg diet. Dietary supplementation did not influence feed intake, feed conversion and condition factor, but increased the final biomass, number of erythrocytes, thrombocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, hemoglobin, glucose, globulins and plasma tri-glycerides in fish fed at a concentration of 12 g/kg diet. After bacterial infection, mortality occurred only in fish fed control treatment, whereas respiratory burst of leukocytes, number of leukocytes and lymphocytes increased in fish that received 12 g of dietary supplementation. The results indicated that dietary supplementation with 12 g of Aquate Fish™ improved biomass and immunity performance of *A. gigas* fingerlings, without negatively affecting blood biochemical parameters.

## 1. Introduction

The Amazon region has an important contribution to the cultivation of native and non-native fish species. *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (pirarucu), a piscivorous air-breather fish, is among the main native species cultivated due to its high valued zootechnical characteristics such as fast growth, tolerance to the high density of storage and resistance to the handling, high meat yield, besides having an excellent acceptance in the national and international market [1–4]. However, its production is still limited by the low availability, high cost of fingerlings [4] and economic losses, due to the large mortalities in the initial phase of production. The handling of *A. gigas* during routine practices in aquaculture production can cause stress to the fingerlings, reducing the resistance to diseases outbreaks, leading to mass mortalities [1,3], caused mainly by aeromoniosis [1,5].

Similar to other industries, aquaculture constantly requires new techniques to increase production and productivity, while maintaining fish health [3,6,7]. However, with the development of global aqua-culture, several problems have arisen, including the deterioration of water quality, parasitic and bacterial diseases [1,3,4,7]. Diets supplemented with immunostimulants based on *Saccharomyces cerevisiae*, which contain beta-glucan polysaccharide, mannanoligosaccharides and chitin have been recommended for improvement in fish production [7–10]. Diets supplemented with immunostimulants may improve fish performance by establishing the intestinal microbiota and better preparing fish immune system. As a consequence, fish are more resistant to stress, including parasitic and infectious diseases [6–10]. Aquate Fish™ is a commercial feed additive that may play a role in the fish defense systems. Pittman et al. [11] demonstrated that salmon fed diets supplemented with Aquate Fish™ showed a significant increase in mucous

\* Corresponding author. Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, 2600, 68903-419, Macapá, AP, Brazil. E-mail address: [marcos.tavares@embrapa.br](mailto:marcos.tavares@embrapa.br) (M. Tavares-Dias).

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.045>

Received 18 July 2018; Received in revised form 9 October 2018; Accepted 20 October 2018

Available online 22 October 2018

1050-4648/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

cell density and cell sizes when compared with fish fed non-supplemented diets, and such effects disappeared after discontinuation of the treatment. *Oreochromis niloticus* fed diets supplemented with Aquate Fish™ had lower ectoparasites levels, higher survival rate and improved in intestinal integrity [12,13]. Therefore, it is necessary to investigate the ideal concentrations of this commercial immunostimulant for the addition in the diet of this Amazonian fish, aiming the improvement of its immunity. This study investigated the effects of the Aquate Fish™, a commercial immunostimulant, in the growth performance, physiology and immunity of *A. gigas*, evaluating the resistance against *Aeromonas hydrophila*.

## 2. Materials and methods

This study was carried out in accordance with the principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA/UFAC: 08/2014).

### 2.1. Experimental diets

Aquate Fish™ (Alltech, USA) is a feed additive containing *Saccharomyces cerevisiae* extracts, zinc proteinate, seaweed meal, selenium and ascorbic acid. The experimental diets were prepared using commercial feed for carnivorous fish with a minimum of 45% crude protein (Presence, USA) and supplemented with four concentrations (0, 6, 9 and 12 g Aquate Fish™/kg diet) defined from the manufacturer's recommendations. The chemical composition of the diets was performed in triplicate, according to the guidelines of the Association of Analysts of Analytical Chemistry [14] (Table 1).

### 2.2. Fish and experimental design

*Arapaima gigas* (12.0 ± 8.0 cm) fingerlings were purchased from a commercial fish farm in Rio Branco (AC, Brazil) and transported to the Aquaculture and Fisheries Laboratory of Embrapa Amapá (AP, Brazil). During the acclimation period, fish were kept in 1000 L tanks with aeration and continuous flow of water and fed four times a day *ad libitum* with commercial feed for carnivores containing 55% crude protein (Presence®, São Paulo, Brazil).

During the feeding trial, 96 fingerlings (59.3 ± 21.3 g and 20.7 ± 2.1 cm) were distributed into 12 tanks of 100 L (n = 3 tanks/treatment; 8 fish/tank) and fed the experimental diets four times a day (8 a.m., 11 a.m., 2 p.m. and 5 p.m.). Fish were fed at 6% of biomass for 30 days. Water renewal and aeration within each tank were kept continuously, and dissolved oxygen (6.6 ± 0.3 mg L<sup>-1</sup>), temperature (29.3 ± 0.1 °C) and pH (5.3 ± 0.3) were daily measured using a multiparameter probe (Horiba U52 model, Kyoto, Japan).

Table 1

Basal composition of commercial ration and proximate composition of the experimental diets.

Parameters	Manufacturer's data	Concentration of diets			
		0 g/kg	6 g/kg	9 g/kg	12 g/kg
Crude protein (%)	45	48.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	47.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	47.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	47.7 ± 0.8 <sup>a</sup>
Dry matter (%)	87	93.5 ± 0.07 <sup>a</sup>	91.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	91.2 ± 0.09 <sup>b</sup>	91.0 ± 0.1 <sup>b</sup>
Ethereal extract (%)	9	2.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.6 ± 1.7 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>b</sup>
Ashes (%)	16	10.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	10.6 ± 0.04 <sup>a</sup>	10.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
Phosphorous (%)	1	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.07 <sup>a</sup>
Calcium (%)	2–3	0.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.1 ± 0 <sup>a</sup>
Vitamin C (mg/kg)	1500	–	–	–	–
Vitamin E (mg/kg)	400	–	–	–	–

Mean values ± standard deviation. Values followed by different letters, on the same line, indicate difference between treatments by the Tukey test (p < 0.05).

### 2.3. Parameters of fish growth

For the evaluation of growth performance, the following parameters were used:

- Initial biomass (kg/m<sup>3</sup>) = initial average weight x total number of fish;
- Final biomass (kg/m<sup>3</sup>) = final mean weight x total number of fish;
- Daily feed intake (% BW/day) = average feed intake (kg)/average biomass gain (kg/m<sup>3</sup>);
- Daily feed consumption = feed quantity (g)/days;
- Daily weight gain = Weight gain (g)/time (days);
- Weight gain = (final weight - initial weight);
- Specific growth rate (SGR) = (ln final weight - ln initial weight) x 100/(days);
- Food efficiency (FE) = 100 × [weight gain (g)/amount of ingested feed (g)];
- Relative condition factor, according to method recommended by Le Cren [15];
- Hepatosomatic index (HSI, %): liver weight (g)/body weight (g) x 100;
- Viscerosomatic index (VSI, %): viscera weight (g)/body weight (g) x 100.

### 2.4. Blood parameters and respiratory activity of leukocytes

After the feeding trial, blood from four fish from each replicate tank (8 per treatment) were sampled by puncture of the caudal vessel in syringes containing sodium heparin (5000 UI mL<sup>-1</sup>). Blood was divided into two aliquots. An aliquot of blood was used to determine the hematocrit by the microhematocrit method, total erythrocytes count in the Neubauer chamber, and the hemoglobin concentration by the cyanomethemoglobin method. With these data, the hematometric indexes of Wintrobe were calculated: mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). Blood extensions were made and panchromically stained with a combination of May Grünwald-Giemsa-Wright, for differential leukocyte count in up to 200 cells of interest, at each extension. These blood extensions were also used to determine the number of leukocytes and total thrombocytes [16]. The nomenclature of leukocyte populations followed the recommendations of Tavares-Dias et al. [17]. The respiratory burst activity was determined according to method of Biller-Takahashi et al. [18]. Briefly, 100 µL of heparinized blood was added to 100 µL of 0.2% nitroblue tetrazolium solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) and the final solution was homogenized and incubated for 30 min at 25 °C. After incubation and a second homogenization, 50 µL from the solution were added to 1 ml of N, N-dimethyl formamide (Sigma, St. Louis, MO, USA). This solution was then homogenized and centrifuged at 3000 g during 5 min. The optical density of supernatant was determined on spectrophotometer (Biospectro SP-220, Curitiba, Brazil) at 540 nm.

The second aliquot of blood was centrifuged at 75G for 5 min (Mod.

5424, Hamburg, Germany) to obtain plasma and determine the concentration of glucose, total protein, albumin, total cholesterol and tri-glycerides using commercial reagent kits (Biotécnica, MG, Brazil), with absorbance readings performed in a spectrophotometer (Biospectro SP-220, Curitiba, Brazil). Globulins content was determined subtracting albumin from total protein levels.

### 2.5. Challenge with inoculation of *Aeromonas hydrophila* and stress

After 30 days of feeding trial, other four fish from each replicate (8 fish/treatment) were challenged with *Aeromonas hydrophila* (ATCC:7966). The fish were inoculated intraperitoneally with  $1.8 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, the lethal concentration (LC<sub>50–96h</sub>) for *A. gigas* [1]. Mortality and clinical signs of bacteriosis were observed for 7 days, after which the surviving fish were subjected to handling stress. The fish were captured individually and subjected to stress by allowing them to struggle out of the water for 60 s [19,20]. After 6 h of handling stress and challenge with *A. hydrophila*, blood was sampled from each fish as previously mentioned and divided into two aliquots for determination of hematocrit, hemoglobin concentration, number of total erythrocytes, thrombocytes, leukocytes and leukocyte respiratory activity, levels of glucose, total protein, albumin, cholesterol, triglycerides and globulins, as described in item 2.4.

### 2.6. Statistical analyses

All data were evaluated on the assumptions of normality and homoscedasticity using Shapiro-Wilk and Bartlett, respectively. Data that showed a normal distribution were analyzed using variance analysis (ANOVA - One Way) followed by the Tukey test, to compare the means. Data that not showed a normal distribution were analyzed using Kruskal-Wallis test, and Dunn test were used to assess differences among medians [21].

## 3. Results

After the feeding trial, most of the growth performance parameters (body length, feed intake, feed conversion, daily weight gain, condition factor and VSI) did not vary with the dietary treatments ( $p > 0.05$ ). There was, however, an increase in the final biomass in fish fed the diet with 12 g of the additive, and a decrease in daily weight gain, weight gain, SGR and HSI in the fish fed 6 g of the additive (Table 2).

Hematocrit, MCHC, respiratory burst, total protein, albumin and number of eosinophils did not vary with the dietary treatment, whereas the number of erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, thrombocytes, hemoglobin, glucose, plasma globulins and triglycerides

Table 2  
Growth performance parameters of *Arapaima gigas* fed the experimental diets for 30 days.

Parameters	Concentration of diets			
	0 g/kg (N = 24)	6 g/kg (N = 24)	9 g/kg (N = 24)	12 g/kg (N = 24)
Initial length (cm)	20.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	20.6 ± 1.7 <sup>a</sup>	20.6 ± 1.6 <sup>a</sup>	21.1 ± 1.7 <sup>a</sup>
Final length (g)	33.2 ± 2.1 <sup>a</sup>	31.6 ± 1.7 <sup>b</sup>	31.6 ± 2.1 <sup>b</sup>	33.9 ± 2.0 <sup>ab</sup>
Initial biomass (kg/m <sup>3</sup> )	2.7 ± 5.7 <sup>a</sup>	2.6 ± 5.6 <sup>a</sup>	2.9 ± 6.0 <sup>a</sup>	2.9 ± 5.8 <sup>a</sup>
Final biomass (kg/m <sup>3</sup> )	9.4 ± 8.1 <sup>a</sup>	7.7 ± 6.9 <sup>a</sup>	9.8 ± 8.2 <sup>a</sup>	10.6 ± 8.8 <sup>b</sup>
Daily weight gain (g)	5.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.4 <sup>b</sup>
Weight gain (g)	148.8 ± 59.3 <sup>a</sup>	116.7 ± 41.4 <sup>b</sup>	137.7 ± 45.6 <sup>a</sup>	160.0 ± 48.2 <sup>a</sup>
Daily feed intake (g)	38.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	36.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	34.9 ± 2.8 <sup>a</sup>	38.1 ± 0.5 <sup>a</sup>
AFC	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.06 <sup>a</sup>
SGR	4.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	4.0 ± 1.1 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.2 <sup>a</sup>
Feed efficiency (%)	94.4 ± 10.7 <sup>a</sup>	88.8 ± 19.6 <sup>a</sup>	88.0 ± 14.1 <sup>a</sup>	98.2 ± 5.6 <sup>a</sup>
Condition factor	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>
HSI (%)	2.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 4.5 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>b</sup>
VSI (%)	9.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	9.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	9.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.8 ± 1.1 <sup>a</sup>

Mean values ± standard deviation. HSI: Hepatosomatic index, VSI: Viscerosomatic index, AFC: Apparent feed conversion, SGR: Specific growth rate. Values followed by different letters, on the same line, indicate difference between treatments by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

were significantly increased ( $p < 0.05$ ) with the addition of 12 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet. Plasma cholesterol showed a significantly increase in fish fed 6 g and 12 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet when compared to fish fed the control diet and 9 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet. Conversely, MCV decreased ( $p < 0.05$ ) in fish fed 12 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet when compared with the fish fed 9 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet. The number of neutrophils decreased ( $p < 0.05$ ) in fish fed 9 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet when compared to the other treatments (Table 3).

After pathogen challenge and handling stress, detection of fish mortality occurred only in fish fed non-supplemented diets (control). Post infection values of Kn, VSI, HSI, glucose, albumin, hematocrit, MCHC, number of monocytes, neutrophils and eosinophils did not vary among the dietary treatments ( $p > 0.05$ ). Nevertheless, protein and globulin levels were significantly higher and MCV was lower ( $p < 0.05$ ) in fish fed with 6 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet than fish fed control diet. Plasma cholesterol was higher in fish supplemented with 6 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg than in fish fed with 9 g and 12 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet ( $p < 0.05$ ). Plasma triglyceride levels were higher in fish fed 9 g Aquate Fish<sup>TM</sup>/kg diet than in fish fed the control diet. Respiratory burst increased ( $p < 0.05$ ) in fish fed diet supplemented with 12 g Aquate Fish<sup>TM</sup> when compared with the other treatments, whereas the number of thrombocytes increased compared to control fish ( $p < 0.05$ ). The number of total leukocytes and lymphocytes increased in fish fed with 6 g Aquate Fish<sup>TM</sup> ( $p < 0.05$ ) when compared with fish fed control diet (Table 4).

## 4. Discussion

Currently, new feeding practices play an important role in global aquaculture. The addition of feed additives to improve dietary quality is currently a common practice by many feed manufacturers to achieve better fish performance [7]. In the current study, the dietary supplementation Aquate Fish<sup>TM</sup> for a duration of 30 days did not influence the survival, body length, feed intake, feed conversion, condition factor in *A. gigas*, fish, but increased biomass in fish supplemented with 12 g of this immunostimulant. Some zootechnical results varied with the level of Aquate Fish<sup>TM</sup> supplementation. Some parameters showed improvement and other inhibition of performance with the dietary inclusion of Aquate Fish<sup>TM</sup>. Pádua et al. [13] demonstrated that *O. niloticus* fed diets supplemented with Aquate Fish<sup>TM</sup> had a higher survival rate, but occurred no effect on specific growth rate and weight gain. MycosorbA<sup>®</sup>, a commercial immunostimulant containing mannano-oligosaccharides derived from yeasts and algae did not have an effect on growth performance in *A. gigas* [2]. Conversely, *Epinephelus coioides* fed diet supplemented with *S. cerevisiae* showed improved weight gain and feed efficiency [22]. Supplementation with 0.1% of *S. cerevisiae* in the

**Table 3**  
Plasma biochemical parameters and blood immune parameters of *Arapaima gigas*, after 30 days feeding the experimental diets.

Parameters	Concentration of diets			
	0 g/kg (N = 12)	6 g/kg (N = 12)	9 g/kg (N = 12)	12 g/kg (N = 12)
Glucose (mg dL <sup>-1</sup> ) Total	24.2 ± 12.6 <sup>b</sup>	35.0 ± 11.2 <sup>b</sup>	20.0 ± 12.3 <sup>b</sup>	44.9 ± 14.8 <sup>a</sup>
protein (g dL <sup>-1</sup> ) Total	3.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.7 <sup>a</sup>
cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	92.2 ± 33.3 <sup>a</sup>	146.8 ± 47.1 <sup>b</sup>	113.1 ± 44.7 <sup>a</sup>	172.3 ± 30.2 <sup>b</sup>
Triglycerides (mg dL <sup>-1</sup> ) –	85.3 ± 28.6 <sup>a</sup>	92.1 ± 41.8 <sup>a</sup>	123.6 ± 45.0 <sup>a</sup>	177.4 ± 102.1 <sup>b</sup>
Globulin (g dL <sup>-1</sup> )	0.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.46 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
Hematocrit (%) –	2.1 ± 0.6 <sup>a,b</sup>	1.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.7 <sup>b</sup>
	28.6 ± 2.2 <sup>a</sup>	28.9 ± 1.4 <sup>a</sup>	27.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	29.4 ± 2.4 <sup>a</sup>
	10.2 ± 1.1 <sup>a,b</sup>	9.9 ± 0.9 <sup>a,b</sup>	9.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	10.9 ± 1.1 <sup>b</sup>
	1.40 ± 0.40 <sup>a,b</sup>	1.30 ± 0.30 <sup>a,b</sup>	1.20 ± 0.40 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.30 <sup>b</sup>
MCV (fL <sup>-1</sup> )	221.1 ± 60.2 <sup>a,b</sup>	225.8 ± 52.3 <sup>a,b</sup>	249.1 ± 61.7 <sup>a</sup>	179.3 ± 37.5 <sup>b</sup>
MCHC (g dL <sup>-1</sup> ) Respiratory	35.7 ± 4.5 <sup>a</sup>	34.2 ± 2.7 <sup>a</sup>	33.1 ± 2.7 <sup>a</sup>	37.1 ± 3.6 <sup>a</sup>
burst Thrombocytes (x 10 <sup>3</sup> )	0.23 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.07 <sup>a</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Leukocytes (x 10 <sup>3</sup> )	19.2 ± 5.6 <sup>a</sup>	27.5 ± 6.7 <sup>a</sup>	24.4 ± 7.8 <sup>a</sup>	40.3 ± 9.6 <sup>b</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Lymphocytes (x 10 <sup>3</sup> )	152.4 ± 42.4 <sup>a</sup>	160.3 ± 36.0 <sup>a</sup>	145.3 ± 45.8 <sup>a</sup>	212.9 ± 41.8 <sup>b</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Monocytes (x 10 <sup>3</sup> )	74.7 ± 24.7 <sup>a</sup>	78.2 ± 20.9 <sup>a</sup>	82.7 ± 29.1 <sup>a</sup>	122.3 ± 30.9 <sup>b</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Neutrophils (x 10 <sup>3</sup> )	4.5 ± 3.2 <sup>a</sup>	4.3 ± 3.2 <sup>a</sup>	4.9 ± 2.9 <sup>a</sup>	10.0 ± 4.8 <sup>b</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Eosinophils (x 10 <sup>3</sup> )	70.9 ± 18.7 <sup>b</sup>	74.8 ± 16.6 <sup>b</sup>	55.3 ± 16.6 <sup>a</sup>	76.6 ± 15.5 <sup>b</sup>
μL <sup>-1</sup> )	2.3 ± 2.5 <sup>a</sup>	3.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	2.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 4.1 <sup>a</sup>

Mean values ± standard deviation. MCV: Mean corpuscular volume, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration. Values followed by different letters, on the same line, indicate difference between treatments by the Dunn test ( $p < 0.05$ ).

diet of *O. niloticus* [23] and 2% in the diet of *Huso huso* [24], as well as 2% of β-glucan combined with mannanoligosaccharides in the diet of *Piaractus mesopotamicus* [9] improved fish growth performances. The previous studies indicated that *S. cerevisiae*-based products were efficient in promoting fish growth and potentially viable for aquaculture use from the production viewpoint.

Physiological indicators of health [6,16] and immune status [2,6,10] are often used to evaluate the efficacy of dietary supplementation of feed additives. In the current study, VSI and HSI of *A. gigas* fed with different Aquate Fish™ levels were not altered, although plasma triglycerides, cholesterol and glucose increased in fish fed 12 g Aquate Fish™. These results indicated that there was no change in the use of lipid and glycogen reserves, since fish did not undergo any food

deprivation during the test. In contrast, no alteration in plasma levels of cholesterol, triglycerides and glucose of *H. huso* supplemented with 1–2% of *S. cerevisiae* in the diet were reported [24]. In the current study, dietary supplementation of Aquate Fish™ showed mixed effects on plasma biochemical and blood immune parameters. On one hand had no effect on hematocrit, MCHC, MCV, respiratory burst of leukocytes, total protein, albumin and number of eosinophils. Similarly, *P. mesopotamicus* supplemented with a combination of 1–8% of β-glucan and mannanoligosaccharides for 30 days, did not change the number of erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, MCHC, VCM, and total plasma protein levels [9]. In *H. huso* supplemented with 1–2% of *S. cerevisiae* in the diet, for 42 days, no changes in plasma levels of total proteins, glucose, erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, MCHC, MCV and

**Table 4**  
Mortality, body, blood and immune parameters of *Arapaima gigas* fed for 30 days with the experimental diets following a bacterial challenge and handling stress.

Parameters	Concentration of diets			
	0 g/kg (N = 11)	6 g/kg (N = 12)	9 g/kg (N = 12)	12 g/kg (N = 12)
Mortality (%)	8.3	0	0	0
Kn	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>
HSI (%)	2.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
VSI (%)	9.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	9.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	9.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	8.2 ± 1.0 <sup>a</sup>
Glucose (mg dL <sup>-1</sup> ) Total	46.3 ± 27.8 <sup>a</sup>	44.3 ± 17.2 <sup>a</sup>	43.7 ± 7.1 <sup>a</sup>	64.9 ± 18.6 <sup>a</sup>
protein (g dL <sup>-1</sup> ) Total	2.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	3.0 ± 0.6 <sup>b</sup>
cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	148.7 ± 27.8 <sup>a,b</sup>	193.1 ± 30.9 <sup>a</sup>	137.7 ± 64.2 <sup>b</sup>	98.0 ± 39.6 <sup>b</sup>
Triglycerides (mg dL <sup>-1</sup> ) –	36.4 ± 16.8 <sup>a</sup>	65.4 ± 42.3 <sup>a,b</sup>	86.4 ± 31.7 <sup>b</sup>	55.5 ± 21.4 <sup>a,b</sup>
Globulin (g dL <sup>-1</sup> )	1.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.4 <sup>a</sup>
Hematocrit (%) –	1.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.6 <sup>a,b</sup>	2.0 ± 0.6 <sup>a,b</sup>
	28.6 ± 3.4 <sup>a</sup>	27.5 ± 2.8 <sup>a</sup>	28.7 ± 2.2 <sup>a</sup>	29.0 ± 2.0 <sup>a</sup>
	10.2 ± 1.4 <sup>b</sup>	11.0 ± 2.2 <sup>a,b</sup>	10.3 ± 2.8 <sup>b</sup>	13.2 ± 3.1 <sup>a</sup>
	2.20 ± 0.40 <sup>b</sup>	2.30 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.2 <sup>a,b</sup>	2.50 ± 0.4 <sup>a,b</sup>
MCV (fL <sup>-1</sup> )	134.7 ± 16.8 <sup>b</sup>	101.6 ± 28.5 <sup>a</sup>	113.2 ± 13.8 <sup>a,b</sup>	120.7 ± 25.3 <sup>a,b</sup>
MCHC (g dL <sup>-1</sup> ) Respiratory	35.8 ± 3.5 <sup>a</sup>	39.8 ± 6.1 <sup>a</sup>	35.9 ± 10.2 <sup>a</sup>	44.5 ± 11.2 <sup>a</sup>
burst Thrombocytes (x 10 <sup>3</sup> )	0.16 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.09 <sup>a</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Leukocytes (x 10 <sup>3</sup> )	40.7 ± 9.4 <sup>c</sup>	55.1 ± 19.4 <sup>a,c</sup>	59.4 ± 10.8 <sup>a,b</sup>	73.2 ± 15.9 <sup>b</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Lymphocytes (x 10 <sup>3</sup> )	258.5 ± 44.9 <sup>a</sup>	355.0 ± 125.6 <sup>b</sup>	310.0 ± 26.8 <sup>a,b</sup>	329.7 ± 55.9 <sup>a,b</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Monocytes (x 10 <sup>3</sup> )	167.2 ± 28.9 <sup>a</sup>	236.1 ± 83.9 <sup>b</sup>	202.4 ± 22.8 <sup>a,b</sup>	218.8 ± 54.4 <sup>a,b</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Neutrophils (x 10 <sup>3</sup> )	10.8 ± 6.4 <sup>a</sup>	13.5 ± 8.4 <sup>a</sup>	16.7 ± 20.1 <sup>a</sup>	18.0 ± 6.1 <sup>a</sup>
μL <sup>-1</sup> ) Eosinophils (x 10 <sup>3</sup> )	77.3 ± 19.7 <sup>a</sup>	99.6 ± 47.1 <sup>a</sup>	84.9 ± 20.1 <sup>a</sup>	88.1 ± 36.8 <sup>a</sup>
μL <sup>-1</sup> )	3.2 ± 2.1 <sup>a</sup>	5.8 ± 8.0 <sup>a</sup>	6.0 ± 4.1 <sup>a</sup>	4.8 ± 4.3 <sup>a</sup>

Mean expression values ± standard deviation. Mean values ± standard deviation. MCV: Mean corpuscular volume, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration. Values followed by different letters, on the same line, indicate difference between treatments by the Dunn test ( $p < 0.05$ ). HSI: Hepatosomatic index, VSI: Viscerosomatic index, Kn: Relative factor of condition.



number of leukocytes were reported [24].

On the other hand, Aquate Fish™ increased the number of several blood cells, such as the total erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, thrombocytes, indicating an improvement of the immune defense response in the *A. gigas*. Amin et al. [8] observed an increase in the activity of phagocytosis and lysozyme, number of leukocytes and percentage of monocytes and neutrophils in *O. niloticus* supplemented for 42 days with 0.3% glucan, indicating an improvement in the innate immunity.

Although handling is a routine practice in fish farming of any kind, it can cause stress during *A. gigas* production, resulting in alterations in fish resistance to diseases [1,3]. In the current study, the use of 12 g Aquate Fish™ caused a reduction of fish mortality after pathogen challenge and improved cellular immune response and respiratory burst of leukocytes in *A. gigas* after experimental infection with *A. hydrophila* and management stress. Similarly, in *P. mesopotamicus* has been demonstrated that supplementation with 0.1 or 1.0%  $\beta$ -glucan, re-spiratory burst of leukocytes, complement hemolytic activity, lysozyme activity and number of leukocytes increased after challenge with *A. hydrophila*, reducing fish mortality [25]. The addition of 0.2 and 0.4% of Glucan-MOS® was also sufficient to positively influence these immune parameters in *P. mesopotamicus* after challenge of stress and infection with *A. hydrophila* [10]. In *E. coioides* supplemented with different concentrations of *S. cerevisiae* and challenged with inoculation of *Streptococcus* sp. and iridovirus, phagocytic activity, respiratory burst of leukocytes, number of leukocytes in the kidney, lysozyme activity and alternative complement activity increased in fish fed with  $10^5$  and  $10^7$  UFC kg<sup>-1</sup> of diet, reducing fish mortality [22]. Therefore, these immunostimulatory supplements improved the innate immunity of the fish, increasing their survival after challenge of immune resistance.

## 5. Conclusions

The results of this study indicate that supplementation with 12 g of Aquate Fish™/kg of diet improved the biomass and immunity performance of *A. gigas* fingerlings, without negatively impacting the hematological parameters investigated. Finally, the 30-day supplementation period was sufficient to stimulate growth performance and to minimize handling stress and *A. hydrophila* infection, modulating innate immunity responses.

## Acknowledgments

This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), through the Pro-Amazônia project (# 230238.00754/2013-61) and a doctoral grant was granted to the first author. The authors also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity research grant awarded to Dr. M. Tavares-Dias (# 303013/2015-0).

## References

- [1] M.K.R. Dias, L.S. Sampaio, A.A. Proietti-Junior, E.T.O. Yoshioka, D.P. Rodrigues, A.F.R. Rodriguez, R.A. Ribeiro, F.S.E.D.V. Faria, R.O.A. Ozório, M. Tavares-Dias, Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. *Vet. Microbiol.* 188 (2016) 12–15, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.001>.
- [2] M.D.F.G. Hoshino, R.G.B. Marinho, D.F. Pereira, E.T.O. Yoshioka, M. Tavares-Dias, R.O.A. Ozório, A.F.R. Rodriguez, R.A. Ribeiro, F.S.E.D.V. Faria, Hematological and biochemical responses of pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae) fed with diets containing a glucomannan product derived from yeast and algae. *Acta Amazonica* 47 (2017) 87–94, <https://doi.org/10.1590/1809-4392201700781>.
- [3] A.F. Lima, A.P. Rodrigues, L.K.F. Lima, P.O. Maciel, F.P. Rezende, L.E.L. Freitas, M. Tavares-Dias, T.A. Bezerra, Alevinagem, recria e engorda do pirarucu, Brasília, DF, Embrapa, (2017).
- [4] H.P. Santana, G.M. Morey, J.P. Lima, J.C.O. Malta, Influência de metazoários parasitas na morte de juvenis de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) criados em uma piscicultura na Amazônia brasileira. *Rev. Bras. Zootecias* 18 (2017) 77–90.
- [5] A.A. Proietti-Junior, L.S. Lima, F.M.N. Cardoso, D.P. Rodrigues, M. Tavares-Dias, Bacterioses em alevinos de pirarucu de cultivo, com ênfase em *Edwardsiella* e *Aeromonose*, Comunicado Técnico 149, Macapá, Embrapa Amapá, (2017).
- [6] Ü. Acar, O.S. Kesbiç, S. Yılmaz, N. Gültepe, A. Türker, Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*, *Aquaculture* 437 (2015) 282–286, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.015>.
- [7] W. Wang, J. Sun, C. Liu, Z. Xue, Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives, *Aquacult. Res.* 48 (2017) 1–23, <https://doi.org/10.1111/are.13161>.
- [8] M. Amin, D. Jusadi, A. Sukenda, E. Harris, Growth performance, non-specific immune and antioxidant response of juvenile tilapia *Oreochromis* sp. feeding on brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplemented diet, *Pakistan J. Biotechnol.* 12 (2015) 139–148.
- [9] H. Hisano, M.P. Soares, F.G. Luiggi, A.C. Arena, Dietary  $\beta$ -glucans and mannano-oligosaccharides improve growth performance and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), *Aquacult. Int.* 26 (2018) 213–223, <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0210-6>.
- [10] M.P. Soares, F.C. Oliveira, I.L. Cardoso, E.C. Urbinati, C.M. Campos, H. Hisano, Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 73 (2018) 133–140, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.046>.
- [11] K. Pittman, New research tool reveals mucosal interaction and dietary influence infighting sea lice infections, *Aquafeed* 5 (2013) 7–11.
- [12] S.B. Pádua, R.N. Menezes-Filho, M.A.A. Belo, M.M. Nagata, A nutritional additive increases survival and reduces parasitism in Nile tilapia during masculinisation, *AQUA Cul. Asia Pacific Mag.* (2014) 24–27 Sep/Oct.
- [13] S.B. Pádua, M.L. Martins, R.N. Menezes-Filho, M.M. Nagata, Uso de Aquate Fish™ durante a formação de juvenis de tilápia: aumento da resistência contra doenças, melhoria na integridade intestinal e no desempenho produtivo, *Rev. Aquat. Feed* (2015) 4–8 Jan/Feb.
- [14] AOAC- Association of official analytical chemists, *Official Methods of Analysis*, sixteenth ed., AOAC, Arlington, 1995.
- [15] E.D. Le Cren, The length–weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*), *J. Anim. Ecol.* 20 (1951) 201–219.
- [16] M.J.T. Ranzani-Paiva, S.B. Pádua, M. Tavares-Dias, M.I. Egami, Métodos para análises hematológicas em peixes, EDUEM, Maringá, 2013.
- [17] M. Tavares-Dias, J.F.M. Barcellos, J.L. Marcon, G.C. Menezes, E.A. Ono, E.G. Affonso, Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture, *Electron. J. Ichthyol.* 2 (2007) 61–68.
- [18] J.D. Biller-Takahashi, L.S. Takahashi, M.V. Saita, R.Y. Gimbo, E.C. Urbinati, Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*, *Braz. J. Biol.* 73 (2013) 425–429, <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>.
- [19] B.A. Barton, R.E. Zitzow, Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water, *Prog. Fish-Cult.* 57 (1995) 267–276, [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1995\)057<0267:PROJW>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1995)057<0267:PROJW>2.3.CO;2).
- [20] E.L. Davis, C.B. Schreck, The energetic response to handling stress in juvenile Coho Salmo, *Trans. Am. Fish. Soc.* 126 (1997) 248–258, [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1997\)126<0248:TERTHS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1997)126<0248:TERTHS>2.3.CO;2).
- [21] J.H. Zar, *Biostatistical Analysis*, fifth ed., Prentice-Hall, New Jersey, 2010.
- [22] C.H. Chiu, C.H. Cheng, W.R. Gua, Y.K. Guu, W. Cheng, Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*, *Fish Shellfish Immunol.* 29 (2010) 1053–1059, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.019>.
- [23] M. Lara-Flores, M.A. Olvera-Novoa, B.E. Guzmán-Méndez, W. López-Madrid, Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture* 216 (2003) 193–201, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6).
- [24] S.H. Hoseinifar, A. Mirvaghefi, D.L. Merrifield, The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*), *Aquaculture* 318 (2011) 90–94, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.043>.
- [25] J.D. Biller-Takahashi, L.S. Takahashi, C.M. Marzocchi-Machado, F.S. Zanuzzo, E.C. Urbinati, Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with  $\beta$ -glucan, *Braz. J. Biol.* 74 (2014) 698–770, <https://doi.org/10.1590/bjb.2014.0083>.

### **CAPÍTULO 3**

**Feed supplementation with commercial immunostimulant affect the growth performance, physiology and immunity of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) subjected to handling stress.**

**Artigo submetido ao periódico Aquaculture**

**Feed supplementation with commercial immunostimulant affect the growth performance, physiology and immunity of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) subjected to handling stress**

Marcia Kelly Reis Dias<sup>1</sup>, Eliane Tie Oba Yoshioka<sup>2</sup>, Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez<sup>3</sup>, Ricardo Amaral Ribeiro<sup>3</sup>, Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana Faria<sup>3</sup>, Rodrigo Otávio Almeida Ozório<sup>4</sup> & Marcos Tavares-Dias<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Tropical Biodiversity, Federal University of Amapá (UNIFAP), AP, Brazil

<sup>2</sup>Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brazil

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Biotechnology and Biodiversity, Federal University of Acre (UFAC), AC, Brazil

<sup>4</sup>Interdisciplinary Center of Marine and Environmental Research (CIIMAR), Porto, Portugal

\* Corresponding author: marcos.tavares@embrapa.br

**Abstract**

This study evaluated the effects of commercial immunostimulant Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E on growth performance, hematology and immunity of *Arapaima gigas* subjected to handling stress. Fish were fed for 30 days on diets supplemented with 0, 4, 6 and 8 g kg<sup>-1</sup> of immunostimulant. Diet with 6 and 8 g kg<sup>-1</sup> improved in final biomass, final length, body weight gain, daily weight gain, daily feed intake and specific growth. In addition, diets with 6 and 8 g kg<sup>-1</sup> decreased the cholesterol levels and increased the mean corpuscular hemoglobin concentration. In fish supplemented with 6 g kg<sup>-1</sup> occurred a decrease in triglycerides and glucose levels. In fish fed with 4 and 6 g kg<sup>-1</sup> immunostimulant, a decrease in monocytes number and an increase in leukocytes respiratory burst of fish supplemented with 8 g kg<sup>-1</sup> were observed. After handling stress, fish fed with 4 and 8 g kg<sup>-1</sup> had an increase in glucose levels and an decrease in globulin levels, while fish fed with 4 and 6 g kg<sup>-1</sup> had an decrease in cholesterol and globulin levels, and an increase in mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). Protein levels decreased in fish fed diet with com 4 g kg<sup>-1</sup>, while lymphocytes number and burst respiratory of leukocytes decreased in fish fed diet with com 8 g kg<sup>-1</sup>. For *A. gigas*, since 6-8 g kg<sup>-1</sup> of this immunostimulant has not negative impacts on the hematological and biochemical parameters, this concentration may be used as a growth promoter in the fish farming.

**Keywords:** aquaculture; blood; immunity; fish; pirarucu; *Saccharomyces cerevisiae*.

## Introduction

The growth of intensive aquaculture requires high stocking densities and the intensification of the handling routine. Such practices often cause unavoidable handling stress to fish and consequently the emergence of opportunistic pathogens, factors that can negatively affect fish health and performance (Biller-Takahashi et al. 2014; Batista et al. 2016; Hisano et al. 2018). Previous studies have demonstrated in fish a significant improvement of growth performance and disease resistance by using feed additives such as immunostimulants and probiotics (Bricknell and Dalmo 2005; Amin et al. 2015; Ramos et al. 2015).

The immunostimulants offer an alternative to probiotics, which have the use limited in many countries due to concern with farmed animals because they may show a greater risk of contracting gastrointestinal diseases. Many countries have a strict legislation on the use of probiotics as food and feed additives (De Baets et al. 2009). Thus, food additives based on *Saccharomyces cerevisiae* or its co-products have been tested for improvement of growth performance and immunity in *Labeo rohita* (Tewary and Patra, 2011), *Huso huso* (Hoseinifar et al. 2011), *Oreochromis niloticus* (Amin et al. 2015; Mannopo et al. 2015), *Piaractus mesopotamicus* (Biller-Takahashi et al. 2014; Hisano et al. 2018), *Rutilus frisii* (Rufchaie and Hoseinifar 2014), *Solea senegalensis* (Batista et al. 2016), *Oncorhynchus mykiss* (Huyben et al. 2017), *Brycon amazonicus* (Montoya et al. 2018) and *Arapaima gigas* (Dias et al. 2019). Many of these studies showed not only the importance of the effects of the immunostimulants in fish farming but also an increase in performance and benefits in feed conversion (Tewary and Patra 2011; Batista et al. 2016).

The walls of *S. cerevisiae* contain glycoproteins, glucan ( $\beta$ -1,3-d-glucan and  $\beta$ -1,6-d-glucan branching), and small quantity of chitin, giving a favorable energetic and protein support compared to other food supplements (Amin et al. 2015). Thus, there is a growing interest of large companies and fish farmers to use *S. cerevisiae* and its derivatives to mitigate the negative impact of intensive farming in the fish health (Greenwood and José 2005). Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E (Biomim, Austria) is an immunostimulant formulated from the standardized autolytic degradation and spray drying of *S. cerevisiae* cells. This feed additive is rich in bioactive components and other essential nutrients (essential amino acids, peptides, carbohydrates of the cell wall, nucleotides and vitamin B complex). Recently, Batista et al. (2016) showed that *S. senegalensis* fed with diets containing Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E had better dietary protein utilization, feed conversion, and longer intestinal villus, with no improvement in immunity.

*Arapaima gigas*, known as pirarucu is the world's largest scaled freshwater fish. It is commonly found in Brazil, Peru, Colombia, and Guiana, where they inhabit large lakes and

slow-running rivers. The fast decline in natural populations due to overfishing and habitat change have prompted private and governmental organizations to finance research on *A. gigas* for restocking and aquaculture purposes (Saint-Paul 1986; Queiroz and Sardinha 1999; Viana et al. 2004; Castello et al. 2005, Crossa and Chaves 2005). It is an excellent candidate species for aquaculture due to its high market price, very high growth rates, reproduction in captivity, and tolerance to poor water quality (Cavero et al. 2003a).

*Arapaima gigas* is an excellent candidate species for aquaculture due to its very fast growth rates, high market price, reproduction in captivity, tolerance to poor water quality, high flesh quality and fillet yield (< 45%), that surpasses other species (Cavero et al. 2003; Oliveira et al. 2012). Disease outbreaks are, however, a primary restriction in the increase of *A. gigas* aquaculture production (Lima et al. 2017). Considering such, the current study aimed to evaluate the effects of dietary supplementation of Levabon Aquagrow<sup>®</sup> E on the growth performance and physiological and innate immunity parameters in *A. gigas*.

## **Materials and methods**

### **Fish and experimental design**

One hundred and forty four *A. gigas* fingerlings were acquired in commercial farming of Rio Branco, Acre State (Brazil) and transported to the Laboratory of Aquaculture and Fisheries of Embrapa Amapá, state of Amapá (Brazil). Fish were acclimated in 1000 L tanks with aeration and continuous water flow and fed *ad libitum* four times a day with a diet containing 55% crude protein (Presence<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil). The levels of dissolved oxygen ( $6.6 \pm 0.3$ ), temperature ( $29.3 \pm 0.1$ ) and pH ( $5.3 \pm 0.3$ ) were daily monitored using a multiparameter probe (Horiba Mod. U52, Kyoto, Japan).

After acclimatization period, fish ( $9.8 \pm 1.4$  g and  $11.7 \pm 0.5$  cm) were distributed in 12 tanks of 100L each (n=3 tanks/treatment, 12 fish/tank). During 30 days, fish were fed the experimental diets, four times a day (8:00, 11:00, 14:00 and 17:00), at 10% of the biomass.

### **Preparation of experimental diets**

The four experimental diets were formulated to be isoproteic (55% crude protein) and isolipidic (9%) supplemented with a immunostimulant (Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E, Biomin, Austria) at 0 (control), 4, 6 or 8 g per kg diet, levels defined by the manufacturer's recommendations. The analyses of the chemical composition of the diets.

**Table 1.** Composition of diets with Levabon® Aquagrow E used in the supplementation of *Arapaima gigas*.

Parameters	Basal diet	Experimental diets
Crude Protein (%)	50.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	52.2 ± 2.6
Dry matter (%)	91.0 ± 0.03 <sup>a</sup>	91.0 ± 0.2
Ethereal extract (%)	3.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.2
Ashes (%)	14.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.1 ± 0.1
Phosphorus (%)	1.4 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.07

### **Growth parameters of the supplemented fish**

After the feeding trial, several zootechnical parameters were evaluated: Weight gain, daily weight gain, final biomass (kg/m<sup>3</sup>), feed conversion ratio (FCR), daily feed intake (%BW/day), specific growth rate (SGR) (Yamamoto et al. 2002) and relative condition factor (Le Cren 1951). The hepatosomatic index (%): liver weight (g)/body weight (g) x 100 and viscerosomatic index (%): viscera weight (g)/body weight (g) x 100 were also calculated.

### **Blood parameters and respiratory activity of leukocytes on supplemented fish**

Blood was collected from 18 fish per treatment by caudal venous puncture, with a heparinized syringe. The blood was divided into two aliquots: first aliquot was used to determine hematocrits through microhematocrit method, total erythrocyte count in a Neubauer chamber, and hemoglobin concentration by the cyanmethemoglobin method. With these data, the hematimetric indexes of Wintrobe: mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were determined. Blood smears were made and stained panchromatically with the May Grünwald-Giemsa-Wright combination, for differential counting of leukocytes in up to 200 cells of interest, at each blood smear. The identification and classification of leukocytes populations followed the recommendations of Tavares-Dias et al. (2007). These blood smears were also used to determine the total number of leucocytes and thrombocytes (Ranzani-Paiva et al., 2013). The leukocytes respiratory burst was determined according to the methods previously described (Sahoo et al. 2005; Biller-Takahashi et al. 2013). The absorbance readings were carried out in a spectrophotometer (Biospectro SP-220, Curitiba, Brazil).

The second blood aliquot was centrifuged at 75 G for 5 min (Centrifuge Mod. 5424, Hamburg, Germany) and the plasma was used to determine the glucose, albumin, total

cholesterol and triglycerides levels performed in a spectrophotometer (Biospectro SP-220, Curitiba, Brazil) with colorimetric kits (Biotécnica, MG, Brazil).

### **Handling stress challenge in supplemented fish**

After the feeding trial, fish (n=18 /treatment) were subjected to a handling stress for 60 seconds, according to Barton and Zitzow (1995) and Davis and Schreck (1997). After a period of six hours of handling stress, blood was sampled for blood biochemical analyses as previously mentioned for the determination of hematocrit, hemoglobin concentration, number of erythrocytes, thrombocytes, leukocytes, respiratory activity of leukocytes, total glucose, total proteins, albumin, total cholesterol, triglycerides, and globulins.

### **Statistical analyses**

All data were evaluated on the assumptions of normality and homoscedasticity using Shapiro-Wilk and Bartlett, respectively. The data that showed a normal distribution were analyzed by variance (ANOVA - One Way), followed by the Tukey test, to compare the means, while the data that showed not a normal distribution were analyzed by Kruskal-Wallis, followed by the Dunn test to compare the medians (Zar 2010).

### **Results**

At the end of the trial, the fish supplemented with 6 and 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E showed an increase (p<0.05) in final biomass, final length, body weight gain, daily weight gain, daily feed intake and specific growth. The remaining growth parameters did not show significant differences between the dietary treatments (Table 2).



**Table 2.** Corporal parameters and growth performance of *Arapaima gigas* supplemented with Levabon® Aquagrow E, during 30 days.

Parameters	Diets concentration			
	0 g kg <sup>-1</sup> (n = 36)	4 g kg <sup>-1</sup> (n = 36)	6 g kg <sup>-1</sup> (n = 36)	8 g kg <sup>-1</sup> (n=34)
Initial length (cm)	11.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	11.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	11.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.7 <sup>a</sup>
Initial weight (g)	10.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	9.6 ± 1.4 <sup>a</sup>	9.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	9.8 ± 1.4 <sup>a</sup>
Final length (cm)	22.8 ± 1.4 <sup>a</sup>	23.0 ± 1.4 <sup>a</sup>	24.3 ± 1.0 <sup>b</sup>	24.3 ± 0.8 <sup>b</sup>
Final biomass (kg/m <sup>3</sup> )	9.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	10.1 ± 0.2 <sup>a,c</sup>	10.9 ± 0.7 <sup>b,c</sup>	11.3 ± 0.1 <sup>b</sup>
Daily weight gain (g)	1.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>b</sup>
Body weight gain	54.5 ± 11.5 <sup>a</sup>	57.9 ± 12.3 <sup>a</sup>	65.5 ± 9.4 <sup>b</sup>	65.8 ± 8.0 <sup>b</sup>
Daily feed intake (g)	24.0 ± 0.001 <sup>a</sup>	24.6 ± 0.003 <sup>a,l</sup>	25.1 ± 0.1 <sup>a,b</sup>	26.0 ± 0.001 <sup>t</sup>
Feed conversion ratio	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.01 <sup>a</sup>
Specific growth rate	6.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	6.5 ± 0.8 <sup>a,b</sup>	6.8 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	6.8 ± 0.3 <sup>b</sup>
Daily feed intake (%BW/day)	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>
Condition factor (Kn)	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>
HSI (%)	1.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.3 <sup>a</sup>
SVI (%)	9.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	8.9 ± 1.0 <sup>a</sup>

Values express mean ± standard deviation. HSI: Hepatosomatic index, HSI: Viscerosomatic index SVI: Specific growth rate. Values followed by different letters on the same line, indicate differences between treatments by Tukey test (p<0.05).

Dietary supplementation of 6 g Levabon® Aquagrow E kg<sup>-1</sup> diet led to a decrease in glucose, while 6 and 8 g Levabon® Aquagrow E kg<sup>-1</sup> diet decreased cholesterol levels and increased (p<0.05) the MCHC. Moreover, hemoglobin levels and neutrophils number decreased in fish supplemented with 4 g Levabon® Aquagrow E kg<sup>-1</sup> diet. The respiratory activity increased and number of lymphocytes decreased (p<0.05) in fish supplemented with 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon® Aquagrow E. However, the number of monocytes decreased (p<0.05) in all treatments, when compared with controls (Table 3).

The handling stress protocol did not cause fish mortality, regardless of the dietary treatment. After 6 h of handling stress, there was increase (p<0.05) in plasma glucose, monocytes and neutrophils number in fish fed with 4 and 8 g Levabon® Aquagrow E kg<sup>-1</sup> diet and a decrease (p<0.05) in total cholesterol. Plasma protein were reduced (p<0.05) in fish fed with 4 g kg<sup>-1</sup>. Dietary supplementation of 8 g Levabon® Aquagrow E kg<sup>-1</sup> diet caused decrease in triglycerides, globulins levels, lymphocytes number leukocytes and respiratory, and an increase in albumin, total leukocytes, monocytes, and neutrophils. Conversely, there was an

increase in hemoglobin in fish fed diet with 4 g kg<sup>-1</sup> and an increase in MCHC in fish fed diet with 4 and 6 g kg<sup>-1</sup>. The hematocrit level decreased in all supplemented groups, when compared with the unsupplemented (control) group (Table 4).

**Table 3.** Blood and immunological parameters of *Arapaima gigas* supplemented in the diet with Levabon® Aquagrow E, during 30 days.

Parameters	Diets composition			
	0 g kg <sup>-1</sup> (n=18)	4 g /kg <sup>-1</sup> (n=18)	6 g kg <sup>-1</sup> (n=18)	8 g kg <sup>-1</sup> (n=18)
Glucose (mg/dL)	72.3 ± 7.7 <sup>a</sup>	41.9 ± 13.4 <sup>b</sup>	33.5 ± 17.2 <sup>b</sup>	101.4 ± 27.7 <sup>a</sup>
Total cholesterol (mg/dL)	175.8 ± 41.6 <sup>a</sup>	110.3 ± 32.6 <sup>b</sup>	111.8±35.4 <sup>b</sup>	125.6 ± 32.3 <sup>b</sup>
Triglycerides (mg/dL)	90.6 ± 51.3 <sup>ab</sup>	64.4 ± 31.1 <sup>b</sup>	103.9 ± 19.0 <sup>ac</sup>	120.2 ± 48.8 <sup>ac</sup>
Albumin (g/dL)	1.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.4 <sup>a</sup>
Hematocrit (%)	33.4 ± 2.5 <sup>a</sup>	30.2 ± 3.0 <sup>a</sup>	31.3 ± 7.4 <sup>a</sup>	31.5 ± 4.2 <sup>a</sup>
Hemoglobin (g/dL)	8.8 ± 33.0 <sup>ab</sup>	7.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	8.9 ± 1.8 <sup>ab</sup>	9.4 ± 1.5 <sup>a</sup>
Erythrocytes (x 10 <sup>6</sup> μL)	1.86 ± 0.30 <sup>ab</sup>	1.49 ± 0.40 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.70 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.70 <sup>ab</sup>
MCV (fL)	184.6 ± 34.1 <sup>a</sup>	224.7 ± 87.9 <sup>a</sup>	162.7 ± 51.3 <sup>a</sup>	247.9 ± 88.8 <sup>a</sup>
MCHC (g/dL)	26.4 ± 5.0 <sup>a</sup>	26.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	29.2 ± 5.8 <sup>b</sup>	29.5 ± 3.4 <sup>b</sup>
Respiratory burst	0.22 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.12 <sup>b</sup>
Thrombocytes (μL)	27.307 ± 10.598 <sup>ab</sup>	20.848 ± 6.810 <sup>a</sup>	32.951 ± 12,490 <sup>b</sup>	26.071 ± 12.641 <sup>ab</sup>
Leukocytes (μL)	188.638 ± 34.105 <sup>ab</sup>	151.060 ± 45.594 <sup>a</sup>	210.280 ± 69.462 <sup>b</sup>	162.608 ± 67.316 <sup>ab</sup>
Lymphocytes (μL)	95.270 ± 20.128 <sup>a</sup>	90.807± 27.701 <sup>a</sup>	113.044 ± 34.331 <sup>a</sup>	87.171 ± 38.757 <sup>b</sup>
Monocytes (μL)	13.591 ± 4.469 <sup>a</sup>	4.844 ± 2.521 <sup>b</sup>	6.337 ± 4.323 <sup>b</sup>	4.574 ± 2.823 <sup>b</sup>
Neutrophils (μL)	78.754 ± 13.891 <sup>a</sup>	54.359 ± 18.213 <sup>b</sup>	89.461 ± 33.967 <sup>a</sup>	69.371 ± 27.814 <sup>a</sup>
Eosinophils (μL)	1.023 ± 1.058 <sup>a</sup>	1.051 ± 1.280 <sup>a</sup>	1.438 ± 1.657 <sup>a</sup>	1.491 ± 1.713 <sup>a</sup>

Values express mean ± standard deviation. MCV Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration. Values followed by different letters on the same line, indicate differences between treatments by Dunn's test (p<0.05).

**Table 4.** Blood and immunological parameters of *Arapaima gigas* submitted to handling stress challenge, after 30 days of supplementation with Levabon® Aquagrow E in the diet.

Parameters	Diets concentration			
	0 g kg <sup>-1</sup> (n=18)	4 g /kg <sup>-1</sup> (n=18)	6 g kg <sup>-1</sup> (n=18)	8 g kg <sup>-1</sup> (n=18)
Glucose (mg / dL)	36.2 ± 7.3 <sup>a</sup>	73.2 ± 12.2 <sup>b</sup>	62.0 ± 21.9 <sup>a</sup>	112.7 ± 24.3 <sup>c</sup>
Total proteins (g/dL)	3.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.6 <sup>a</sup>
Total cholesterol (mg / dL)	137.2 ± 26.5 <sup>a</sup>	89.5 ± 36.5 <sup>b</sup>	87.7 ± 36.4 <sup>b</sup>	121.1±31.7 <sup>ac</sup>
Triglycerides, (mg/dL)	125.6 ± 36.7 <sup>a</sup>	123.4 ± 15.6 <sup>a</sup>	116.7±44.4 <sup>ab</sup>	100.0 ± 21.9 <sup>b</sup>
Albumin (g/dL)	0.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.3 <sup>b</sup>
Globulin (g/dL)	2.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.6 <sup>b</sup>
Hematocrit (%)	34.1 ± 3.1 <sup>a</sup>	29.7 ± 3.3 <sup>b</sup>	27.0 ± 4.1 <sup>b</sup>	30.4 ± 2.3 <sup>b</sup>
Hemoglobin (g/dL)	8.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	9.9 ± 1.1 <sup>b</sup>	9.2 ± 4.3 <sup>ab</sup>	9.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
Erythrocytes (x 10 <sup>6</sup> µL)	1.76 ± 0.26 <sup>ab</sup>	1.98 ± 0.48 <sup>b</sup>	1.81 ± 0.50 <sup>b</sup>	1.45 ± 0.37 <sup>a</sup>
MCV (fL)	197.6 ± 32.5 <sup>b</sup>	160.1 ± 51.1 <sup>a</sup>	56.1 ± 7.2 <sup>a</sup>	213.3 ± 59.3 <sup>b</sup>
MCHC (g/dL)	24.6 ± 3.6 <sup>a</sup>	33.6 ± 2.9 <sup>b</sup>	33.3± 9.1 <sup>b</sup>	29.1 ± 3.6 <sup>ab</sup>
Respiratory burst	0.26 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>b</sup>
Thrombocytes (µL)	37.697 ± 12.498 <sup>a</sup>	29.686 ± 14.210 <sup>a</sup>	72.150 ± 28.761 <sup>a</sup>	25.193 ± 13.371 <sup>a</sup>
Leukocytes (µL)	179.625 ± 27.166 <sup>a</sup>	200.573 ± 48.850 <sup>ab</sup>	478.595±117.776 <sup>b</sup>	146.644 ± 38.237 <sup>a</sup>
Lymphocytes (µL)	124.523 ± 18.089 <sup>a</sup>	124.917 ± 28.855 <sup>a</sup>	215.367 ± 58.692 <sup>a</sup>	80.234 ± 18.167 <sup>b</sup>
Monocytes (µL)	6.328 ± 3.193 <sup>a</sup>	6.355 ± 3.593 <sup>a</sup>	23.930 ± 6.266 <sup>b</sup>	7.034 ± 3.616 <sup>a</sup>
Neutrophils (µL)	47.781 ± 14.662 <sup>a</sup>	68.314 ± 25.020 <sup>a</sup>	236.904 ± 46.011 <sup>b</sup>	58.283 ± 20.729 <sup>a</sup>
Eosinophils (µL)	993 ± 889 <sup>a</sup>	986 ± 585 <sup>a</sup>	2.393 ± 1.250 <sup>a</sup>	1.092 ± 1.168 <sup>a</sup>

Values express mean ± standard deviation. MCV Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration. HSI: Hepatosomatic index, HSI: Viscerosomatic index, Kn: Relative condition factor. Values followed by different letters on the same line, indicate differences between treatments by Dunn's test (p<0.05).

## Discussion

Increasing the survival and growth rates is one of the most important issues that fish farmers face, especially in the initial stages of the fish's life cycle. *Sacharomyces cerevisiae*, a byproduct of beer industry, has been recommended as a dietary supplementation due to its high proteins content, immunostimulant effects, and growth improvements (Hoseinifar et al. 2011; Tewary and Patra 2011; Amin et al. 2015; Mannopo et al. 2015; Huyben et al. 2017; Dias et al. 2019). *Arapaima gigas* supplemented with 6 and 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E increased the in final biomass, final length, body weight gain, daily weight gain, daily feed intake and specific growth. This enhanced growth performance of the fish fed with a diet containing *S. cerevisiae* can be attributed to increment health status, provision of nucleotides, high digestibility, stimulation of gastric development and/or enzymatic secretion (Tewary and Patra 2011; Hoseinifar et al. 2011). Similar results were reported for *L. rohita* (Tewary and Patra, 2011), *H. huso* (Hoseinifar et al. 2011) and *O. niloticus* (Amim et al. 2015) in a supplemented diet with different concentrations of *S. cerevisiae*. *Solea senegalensis* supplemented with diets containing 4 g kg<sup>-1</sup> of Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E showed greater use of net protein and feed conversion, as well as longer intestinal villi, but had no changes in body weight and specific growth rate (Batista et al. 2016). However, low supplementation of *S. cerevisiae* (9 x 10<sup>5</sup> CFU/g) in *Leporinus macrocephalus* had no improvements in the zootechnical performance parameters (Lima et al. 2015).

The analysis of blood parameters is an important tool that can be used as an effective and sensitive index to monitor the physiological and pathological changes in fish populations (Tavares-Dias et al. 2007; Hoseinifar et al. 2011; Tewary and Patra 2011; Ranzani-Paiva et al., 2013; Dias et al. 2019). The plasma glucose levels in *A. gigas* feed with 6 g kg<sup>-1</sup> of Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E decreased, as well as the levels of cholesterol in fish supplemented with 6 and 8 g kg<sup>-1</sup> and the triglycerides and hemoglobin levels in fish supplemented with 4 g kg<sup>-1</sup>. Hemoglobin increased in fish *A. gigas* supplemented with 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E and decreased in fish increase in supplemented with 4 g kg<sup>-1</sup>, while the MCHC increased in fish supplemented with 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon<sup>®</sup> Aquagrow. Therefore, such hematological and biochemical changes in *A. gigas* supplemented with Levabon<sup>®</sup> Aquagrow E indicated influence in the metabolic processes. Similarly, in *A. gigas* fed with Mycosorba<sup>+</sup><sup>®</sup>, a dietary product based on *S. cerevisiae*, there was also a reduction in glucose and triglyceride levels, while the total cholesterol levels increased in fish who received 4 g/kg of the product in the diet (Hoshino et al. 2017). In contrast, Hoseinifar et al. (2011) did not find any changes in the erythrocyte parameters (erythrocytes, hematocrit, and hemoglobin) and metabolic factors (cholesterol and

glucose) of *H. huso* in a diet with 10 or 20 g kg<sup>-1</sup> of *S. cerevisiae*. For *A. gigas*, the supplementation with Aquate Fish™ did not influence in number of erythrocytes, hemoglobin, glucose, globulins and plasma triglycerides (Dias et al., 2019).

The immunostimulants are compounds that modulate the immune system, increasing the resistance (Bricknell and Dalmo 2005) against diseases and stress of fish. In fish, dietary intake of immunostimulant based on lipopolysaccharides of yeasts cell-wall has advantages, and it is a useful method of exposure in large-scale fish culture; and hence, has been evaluated in various studies (Hoseinifar et al. 2011; Tewary and Patra 2011; Rufchaie and Hoseinifar 2014; Amin et al. 2015; Mannopo et al. 2015; Huyben et al. 2017; Hoshino et al. 2017). *Arapaima gigas* supplemented with 4 to 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon® Aquagrow E showed a decrease in the total number of total monocytes. These changes may negatively influence the response of defense in these fish supplemented. However, in *P. mesopotamicus* fed with β-glucan, the total number of leucocytes and thrombocytes increased with the concentrations of immunostimulant (Biller-Takahashi et al. 2014). In *O. niloticus* supplemented with *S. cerevisiae*, there was also a gradual increase in the total number of leukocytes with higher concentrations (5-10 g kg<sup>-1</sup>) of the immunostimulant (Manoppo et al. 2015). For *A. gigas*, dietary supplementation with Aquate Fish™ did not influence in number of thrombocytes, leukocytes, lymphocytes and monocytes (Dias et al., 2019).

The respiratory activity of leukocytes increased in *A. gigas* supplemented with 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon® Aquagrow E, while the number of lymphocytes decreased, and number of monocytes was lower in all treatments. As the respiratory burst is an indicator of innate immunity of fish, this increase express a good inflammatory response and a high rate of phagocytosis, followed by an intense oxygen consumption (Biller-Takahashi et al. 2013; Rebl and Goldammer 2018; Dias et al. 2019), which could increase the resistance to infections and stress (Tewary and Patra 2011; Huyben et al. 2017). Similarly, in *L. rohita* the respiratory burst of leukocytes increased after feeding with high concentrations of *S. cerevisiae*, 50-100 g kg<sup>-1</sup> (Tewary and Patra 2011). However, in *A. gigas* fed with concentrations of MycosorbA<sup>+</sup>®, there were no benefits on respiratory burst (Hoshino et al. 2017). Therefore, high concentrations of *S. cerevisiae* can improve the innate immunity of fish on intensive cultivation, contributing to an improvement in production and productivity.

With the efforts for increasing the production of *A. gigas*, the current fish farming systems cause stress and make them more prone to diseases, resulting in economic losses due to mortality (Lima et al. 2017). To mitigate this effect, immunostimulants based in *S. cerevisiae* may be a promising practice. However, these compounds should be admissible for therapeutic

purposes in the routine of fish farming. This study revealed that a diet content with *S. cerevisiae* had no significant effects on *A. gigas* survival to handling stress. Similar results were reported for *O. mykiss* fed with *S. cerevisiae* when submitted to stress by cannulation (Huyben et al. 2017) and *L. macrocephalus* submitted to stress by capture (Lima et al. 2015). However, to prevent stress in intensive fish farming of *A. gigas*, an intervention with *S. cerevisiae*, could be necessary regarding immunostimulants. The beneficial yeasts that manipulate the gut microbiota through diet supplementation are a good approach from both nutritional and immunological aspect.

The welfare of fish population can be analyzed with the help of some biochemical blood parameters, for example, glucose and total proteins. In addition, the levels of glucose are considered specific indicators of sympathetic activation during stress conditions, and total protein level is the most important indicator of the biochemical nutrition of fish (Hoseinifar et al. 2011; Lima et al. 2015; Rebl and Goldammer 2018). After 6 h of handling stress, there was an increase in the levels of plasma glucose in *A. gigas* fed with 4 and 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon® Aquagrow E, while the total cholesterol, and MCV decreased in fed with 4 and 6 g kg<sup>-1</sup>. Therefore, these changes are due to the stress that the fish were submitted. After the stress can occur a higher release of glucose into the bloodstream due to a bigger rate of oxygen absorption by the gills, the increased ventilation rate, the branchial flow stimulation, and high capacity of oxygen diffusion (Lima et al. 2006; Huyben et al. 2017). In response to stress, cortisol increases the metabolic capacity of the liver to meet the increased energy demand and can reduce the number of circulating lymphocytes (Rebl and Goldammer 2018; Montoya et al. 2018).

The levels of total proteins decreased in fish fed with 4 g kg<sup>-1</sup> after 6 h of handling stress, as well as the levels of triglycerides and respiratory burst of leukocytes of *A. gigas* that received 8 g kg<sup>-1</sup> of Levabon® Aquagrow E, while hemoglobin, the total number of leukocytes, monocytes, and neutrophils increased. Therefore, as the respiratory burst of leukocytes is an indicator of innate immunity (Dias et al. 2019), this decrease express a prejudice to defense system of *A. gigas* after stress. However, in *A. gigas* supplemented with Aquate Fish™ was reported increase in respiratory burst of leukocytes after challenge with handling stress and inoculation com *Aeromonas hydrophilla* (Dias et al. 2019). Despite this decrease on innate immunity, there was immunostimulation of leukocytes after the handling stress in fish that received a higher concentration of Levabon® Aquagrow E on their diet, indicating an additional improve cellular immunity. Bricknell and Dalmo (2005) suggest that the fingerlings phase is the best time to immunomodulation of the immune system because at this stage the fish have

more potentially mature cells and insertion of immunostimulants molecules that enhance the immune system positively.

### Conclusions

This is the first study providing hematological and biochemical analyses on *A. gigas* fed with diets supplemented with Levabon® Aquagrow E. Our results indicate that diets containing 6-8 g kg<sup>-1</sup> Levabon® Aquagrow E may be used during a long period to promote growth in *A. gigas* fingerling without causing negative impacts on physiological parameters of the fish.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### Ethical Disclosures

This study was conducted in accordance with the principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFAC: 08/2014).

### Acknowledgments

This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), through the Pro-Amazônia project (# 230238.00754 / 2013-61) and a doctoral grant was granted to the first author. The authors also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity research grant awarded to M. Tavares-Dias (# 303013/2015-0).

### References

- Amin M, Jusadi D, Sukenda A, Harris E (2015) Growth performance, non-specific immune and antioxidant response of juvenile tilapia *Oreochromis* sp. feeding on brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplemented diet. Pak J Biotechnol 12: 139-148.
- Cavero BAS, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassú DR, Gandra AL, Crescêncio R (2003) Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. Pesq Agropec Bras 38: 103-107.
- 1.1.1 Barton BA, Zitzow RE (1995) Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. Progr Fish-Cult 57: 267-276.
- Batista S, Medina A, Pires MA, Moriñigo MA, Sansuwan K, Fernandes JMO, Valente, LMP, Ozório RO (2016) A. Innate immune response, intestinal morphology and microbiota changes in *Senegalese sole* fed plant protein diets with probiotics or autolysed yeast. Appl Microbial Cell Physiol 100: 7223–7238. doi: 10.1007/s00253-016-7592-7.
- Biller-Takahashi JD, Takahashi LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC (2013) Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus*



*mesopotamicus*. Braz J Biol 73: 425-429. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>

Biller-Takahashi JD, Takahashi LS, Marzocchi-Machado CM, Zanuzzo FS, Urbinati, EC (2014) Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with  $\beta$ -glucan. Braz J Biol 74: 698-703. <http://dx.doi.org/10.1590/bjb.2014.0083>

Bricknell I, Dalmo RA (2005) The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish Shellfish Immunol 19: 457-472. doi: 10.1016/j.fsi.2005.03.008

1.1.2 Davis EL, Schreck CB (1997) The energetic response to handling stress in juvenile *coho salmo*. Trans Am Fish Soc 126: 248-258.

1.1.3 De Baets L, Van Iwaarden P, Meeus N, Schimmel H, Philipp W, Emons H (2009) First certified reference materials for molecular fingerprinting of two approved probiotic *Bacillus strains*. Int J Food Microbiol 129: 16-20. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.028

1.1.4 Dias MKR, Yoshioka ETO, Rodriguez AFR, Ribeiro RA, Farias FSEDV, Ozório ROA, Tavares-Dias M (2019) Growth, physiological and immune responses of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) to *Aeromonas hydrophila* challenge and handling stress following feeding with immunostimulant supplemented diets. Fish and Shellfish Immunology 84: 843–847. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.045>

Hisano H, Soares MP, Luiggi FG, Arena AC (2018) Dietary  $\beta$ -glucans and mannanoligosaccharides improve growth performance and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Aquacul Int 26: 213–223.

Hoseinifar SH, Mirvaghefi A, Merrifield DL (2011) The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). Aquaculture 318: 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.043>

Hoshino MDFG, Marinho RGB, Pereira DF, Yoshioka ETO, Tavares-Dias M, Ozorio R OA, Rodriguez AFR, Ribeiro RA, Faria FSEDV (2017) Hematological and biochemical responses of pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae) fed with diets containing a glucomannan product derived from yeast and algae. Acta Amaz 47: 87 – 94. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201700781>.

Huyben D, Vidakovic A, Nyman A, Langeland M, Lundh T, Kiessling A (2017) Effects of dietary yeast inclusion and acute stress on postprandial whole blood profiles of dorsal aorta-cannulated rainbow trout. Fish Physiol Biochem 43:421–434. doi: 10.1007/s10695-016-0297-0

- Lima KS, Cipriano FS, Oliveira-Júnior FM, Tonini WCT, Souza RHB, Simões IGPC, Braga LGT (2015) Performance and hematological variables of piavuçu whose diets were supplemented with phytobiotic and probiotic additives. *Semina: Ciências Agrárias* 36: 2881-2892. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n4p2881
- Lima AF, Rodrigues AP, Lima LKF, Maciel PO, Rezende FP, Freitas LEL, Tavares-Dias, M, Bezerra TA (2017) Alevinagem, recria e engorda do pirarucu. Brasília, DF, Embrapa, p. 152.
- Lima LC, Ribeiro LP, Leite RC, Melo DC (2006). Estresse em peixes. *Rev Bras Reprod Anim* 30:113-117.
- Manoppo H, Manurung UN, Tumbol RA (2015) Efficacy of baker's yeast as immunostimulant in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int J Chemtech Res* 8: 1396-1402.
- Montoya LNF, Favero GC, Zanuzzo FS, Urbinati EC (2018) Distinct  $\beta$ -glucan molecules modulates differently the circulating cortisol levels and innate immune responses in matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish Shellfish Immunol* 83:314–320. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.042>
- Ramos MA, Gonçalves JFM, Batista SCB, Pires MA, Rema P, Ozório ROA (2015) Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. *Fish and Shellfish Immunol* 45: 19-26. doi: 10.1016/j.fsi.2015.04.001. Epub 2015 Apr 9.
- Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami MI (2013) Métodos para análises hematológicas em peixes. Eduem, Maringá.
- Rebl A., Goldammer, T., 2018. Under control: the innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. *Fish Shellfish Immunol* 77: 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.016>.
- Rufchaie R, Hoseinifar SH (2014) Effects of dietary commercial yeast glucan on innate immune response, hematological parameters, intestinal microbiota and growth performance of white fish (*Rutilus frisi*) fry. *Croat J Fish* 72: 156-163. <http://dx.doi.org/10.14798/72.4.772>
- Oliveira EG, Pinheiro AB, Oliveira VQ, Silva ARM, Moraes MG, Rocha IRCB, Sousa RR, Costa FHF (2012) Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in cages. *Aquaculture* 370-371: 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.027>
- Sahoo Pk, Kumari J, Mishra Bk (2005) Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *J Appl Ichthyol* 21: 151-5. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2004.00606.x>

- Tavares-Dias M, Barcellos JFM, Marcon JL, Menezes GC, Ono EA, Affonso EG (2007) Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture. *Electron J Ichthyol* 2: 61-68.
- Tewary A, Patra BC (2011) Oral administration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth promoter and immunomodulator in *Labeo rohita* (Ham.). *J Aquac Res Dev* 2: 1-7.
- Yamamoto T, Shima T, Furuita H, Suzuki N (2002) Influence of feeding diets with and without fish meal by hand and by self-feeders on feed intake, growth and nutrient utilization of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 214: 289–305. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00035-2)
- Zar JH (2010) *Biostatistical analysis*. 5<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall, New Jersey.

## **CAPÍTULO 4**

***Mansoa alliacea* extract improve growth performance and innate immunity of *Arapaima gigas* challenged with *Aeromonas hydrophila* and stress of handling**

**Artigo a ser submetido ao periódico Fish and Shellfish Immunology**

***Mansoa alliacea* extract improve growth performance and innate immunity of *Arapaima gigas* challenged with *Aeromonas hydrophila* and stress of handling**

Marcia Kelly Reis Dias<sup>a</sup>, Eliane Tie Oba Yoshioka<sup>b</sup>, Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez<sup>c</sup>, Ricardo Amaral Ribeiro<sup>c</sup>, Caio Pinho Fernandes<sup>a</sup>, Rodrigo Otávio Almeida Ozório<sup>d,e</sup> & Marcos Tavares-Dias<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Macapá (UNIFAP), AP, Brazil.

<sup>b</sup> Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal do Acre (UFAC), AC, Brazil.

<sup>d</sup> Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), Porto, Portugal

<sup>e</sup> Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto, Portugal.

## Resumo

Este estudo investigou pela primeira vez os efeitos da suplementação dietética com *Mansoa alliacea* na aquicultura e em parâmetros de crescimento, sanguíneos e imunidade inata. *Arapaimas gigas* foram alimentados durante 30 dias com dieta contendo 0, 4, 8 e 12 g/Kg de extrato de *M. alliacea*, em seguida foram desafiados com *Aeromonas hydrophilla* e estresse de manejo. Após 30 dias de alimentação com 8 g/kg de extrato *M. alliacea* houve aumento no peso final, biomassa final, ganho de peso diário, taxa de crescimento específico, eficiência alimentar, níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, proteínas totais e globulinas, mas uma redução os níveis plasmáticos de albumina. A suplementação com 8 e 12 g kg<sup>-1</sup> aumentou o número de trombócitos totais, mas dietas com extrato de *M. alliacea* não alterou o colesterol, hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, VCM, CHCM, número de leucócitos e burst respiratório de leucócitos. Após o desafio, os peixes suplementados com 8 g/kg de *M. alliacea* apresentaram aumento nos níveis de glicose, globulinas e albumina, enquanto os peixes suplementados com 8 e 12 g kg<sup>-1</sup> tiveram aumento no burst respiratório de leucócitos. Os níveis de triglicerídeos plasmáticos reduziram nos peixes suplementados com 4, 8 e 12 g/kg de *M. alliacea*, enquanto o número de neutrófilos aumentou, mas o número de trombócitos totais, leucócitos totais e linfócitos aumentaram somente nos peixes suplementados com 12 g/kg. Finalmente, esses resultados mostraram que a suplementação com 8 g/kg de *M. alliacea* foi eficiente na melhoria do crescimento e imunidade inata de *A. gigas* e, portanto, pode ser usada na aquicultura deste peixe amazônico.

**Palavras-Chave:** Imunoestimulante, peixe de água doce, nutrição, terapia herbal

## 1. Introdução

A floresta amazônica abriga grande parte da biodiversidade global, e possui grande riqueza de espécies de plantas e muitas delas são ricas em produtos bioativos, como é o caso das plantas medicinais [1]. Atualmente, o crescente uso de fitoterápicos associado à intensa demanda por produtos biotecnológicos atraiu o forte interesse da indústria da aquicultura, que é um dos setores produtores de alimentos para animais que mais cresce no mundo. Plantas medicinais são fontes ricas de compostos bioativos mais seguros e baratos, com propriedades como anti-stress, promotoras de crescimento, estimulação do apetite, aumento da tonicidade e imunestimulação em peixes. Conseqüentemente, o uso de imunostimulantes fitoterápicos como suplementos alimentares pode melhorar a imunidade inata dos peixes de cultivo [2-8], proporcionando resistência a patógenos e diminuindo o estresse [5,7]. Além disso, o uso de fitoterápicos na aquicultura poderia reduzir os custos de tratamento em peixes de cultivo e ser mais ecologicamente correto, já que eles tendem a ser mais biodegradáveis do que as moléculas sintéticas [6-8]. Os produtos fitoterápicos incluídos como suplementos dietéticos minimizam os riscos associados aos quimioterápicos e constituem um dos métodos mais promissores de controle de doenças na aquicultura [4-6,8-9]. Assim, o uso de imunostimulantes fitoterápicos como suplementos dietéticos pode melhorar a imunidade inata dos peixes de cultivo [2-8], proporcionando resistência a patógenos e diminuindo o estresse [5,7]. Além disso, o uso de fitoterápicos na aquicultura poderia reduzir os custos com tratamentos em peixes [6-8]. Os produtos fitoterápicos incluídos como suplementos alimentares minimizam os riscos associados aos quimioterápicos e constituem um dos métodos mais promissores de controle de doenças na aquicultura [4-6,8-9]. Conseqüentemente, o desenvolvimento de novos aditivos para a alimentação de peixes de cultivo tem chamado atenção de pesquisadores e produtores [10].

As práticas de manejo nas pisciculturas tornam os peixes suscetíveis a surtos de doenças infecciosas e parasitárias em decorrência da alta densidade de estocagem e má qualidade da água, o que pode levar a diminuição do bem-estar dos animais, a alterações fisiológicas e aumentando do risco de doenças, pois facilitam a disseminação de patógenos [4,7]. Assim, recentemente, extratos e óleos essenciais de plantas medicinais têm sido utilizados para melhorar o desempenho de crescimento e a imunestimulação em diferentes espécies de peixes entre essas plantas estão *Cotinus coggyri* [2], *Zingiber officinale* [10], *Mentha piperita* [4], *Allium cepa* [3], *Allium sativum* [5,10], *Nigella sativa* [6], *Mespilus germanica* [11] e *Stachys lavandulifolia* [8]. Portanto, a busca por produtos fitoterápicos alternativos estimulou o uso de produtos obtidos a partir de plantas medicinais na aquicultura. Até o presente momento,

*Mansoa alliacea* Gentry (Bignoniaceae) ainda não foi investigada como promotora de crescimento e estimulante para espécies de peixes, incluindo *Arapaima gigas* (Arapaimidae), cuja produção é importante para a indústria da piscicultura da Amazônia, mas que sofre com grandes perdas econômicas causadas por agentes patogênicos [12].

*Mansoa alliacea* é uma planta medicinal conhecida como cipó-alho, alho, alho da floresta ou ajo sacha por causa do forte odor de alho exalado de suas folhas, caules, flores e frutos quando são macerados. Essa espécie de planta nativa da Amazônia que se espalhou para outras partes do mundo, geralmente ocorre longe de corpos de água, em áreas sombreadas e com baixa densidade de vegetação, uma vez que não é capaz de crescer em áreas alagadas ou em campos abertos. Essa Bignoniaceae é um arbusto que tem flavonóides, terpenos, taninos, naftoquinonas, alcalóides e alicina como principais compostos químicos [1,13-14]. As folhas, a casca e raiz de *M. alliacea* têm sido muito utilizadas pelas tribos indígenas e populações de cidades e vilas na Amazônia, para o tratamento de algumas doenças, pois tem efeitos analgésico, antiinflamatório e anti-reumático, além de ser amplamente utilizadas para artrite, reumatismo, dores no corpo, dores musculares e lesões [13-14]. Contudo, como os efeitos dessa planta medicinal em peixes da aquicultura ainda são desconhecidos, assim objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação dietética de extratos de *M. alliacea* no crescimento, parâmetros sanguíneos e imunológicos de *A. gigas*. Além da realização de desafio com *Aeromonas hydrophila* após estresse de manejo.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Peixes e aclimação**

Alevinos de *A. gigas* foram adquiridos de uma piscicultura comercial de Rio Branco, Estado do Acre (Brasil) e aclimatados durante 30 dias em tanque de 1.000L, com fluxo contínuo de água e aeração constante, para todos os ensaios deste estudo. Durante esse período os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial contendo 55% de proteína bruta, quatro vezes ao dia. Diariamente, foi removida a matéria orgânica do fundo dos tanques e os níveis de oxigênio dissolvido ( $6,6 \pm 0,3$ ), temperatura ( $30,1 \pm 0,2$ ) e pH ( $5,4 \pm 0,2$ ) medidos com uma sonda multiparâmetros (Horiba, modelo U52, Kyoto, Japão).

Este estudo foi realizado em conformidade com os princípios adotada pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Acre (CEUA/UFAC: N° 08/2014).



## 2.2. Preparação dos extratos alcoólicos de *Mansoa alliacea*

Folhas de *M. alliacea* foram coletadas na cidade de Porto Grande, estado do Amapá (Brasil) e espécimes vouchers depositadas no herbário do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (Voucher: Tavares-Dias001-HAMAB/IEAP). As folhas frescas de *M. alliacea* foram trituradas e maceradas em cadinho de vidro para extração hidroalcoólica da solução. A proporção de planta/solvente foi de 1:10 (w/v). Após extração, os extratos foram estocados e protegidos da luz, para utilização nas dietas de *A. gigas*.

## 2.3. Preparação das dietas com extratos de *Mansoa alliacea*

As dietas foram preparadas usando uma ração comercial com 45% de proteína bruta (Presence<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), na qual adicionou-se 0, 4, 8 e 12 g/Kg de extrato de *M. alliacea*. Essas concentrações foram definidas a partir de recomendações para *Allium sativum* [15]. A análise da composição química das dietas preparadas com diferentes concentrações de *M. alliacea* foi realizada em triplicata, de acordo com as diretrizes da Associação de Analistas Oficiais de Química Analítica [16]. Somente os níveis de cálcio foram diferentes ( $p > 0.05$ ) entre as dietas experimentais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição basal da ração comercial e composição das dietas experimentais com extrato de *Mansoa alliacea* para suplementação de *Arapaima gigas*.

Parameters	Basal diet	Concentração das dietas			
		0 g/kg	4 g/kg	8 g/kg	12 g/kg
Proteína Bruta (%)	45	46.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	46.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	44.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	46.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
Matéria seca (%)	87	92.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	91.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	91.4 ± 0.08 <sup>a</sup>	91.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
Extrato etéreo (%)	9	4.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.03 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.07 <sup>a</sup>
Cinzas (%)	16	11.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	11.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	10.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	12.0 ± 0.3 <sup>a</sup>
Fósforo (%)	1	0.9 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.08 <sup>a</sup>
Cálcio (%)	2-3	0.09 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.01 <sup>c</sup>

Valores expressam média ± desvio padrão. Composição dos micronutrientes na dieta basal: Vitamina E: 400 mg/kg e Vitamina C: 600 mg/kg. Valores médios ± desvio padrão. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha significam diferenças entre os tratamentos indicado pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## 2.4. Desenho experimental com dietas contendo extratos de *Mansoa alliacea*.

Alevinos de *A. gigas* foram distribuídos em 12 tanques de 100L, constituindo 4 tratamentos (0, 4, 8 e 12 g/kg de extrato de *M. alliacea*) e 3 repetições com 8 peixes em cada (N = 24). Durante os 30 dias de ensaio, os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia (8:00,

11:00, 14:00 e as 17:00) na proporção de 6% da biomassa dos animais, com rações experimentais.

Durante todo o experimento o fluxo de água foi mantido contínuo e os níveis de oxigênio dissolvido ( $6,8 \pm 0,4$ ), temperatura ( $29,3 \pm 0,2$ ) e pH ( $5,3 \pm 0,2$ ) foram medidos diariamente usando uma sonda multiparâmetros (Horiba, modelo U52, Kyoto, Japão).

## 2.5. Parâmetros de crescimento dos peixes

Após os 30 dias de suplementação com 0, 4, 8 e 12 g/kg de *M. alliacea* todos os peixes foram pesados e medidos para avaliação dos seguintes parâmetros de crescimento:

- Biomassa final ( $\text{kg/m}^3$ ) = peso médio final x número total de peixes;
- Taxa de conversão alimentar (FCR) = Consumo médio de ração (kg)/ganho de biomassa média ( $\text{kg/m}^3$ );
- Ingestão diária de ração = quantidade de ração (g)/dias;
- Ganho de peso diário = Ganho de peso (g)/tempo(dias);
- Ganho de peso = (peso final - peso inicial);
- Taxa crescimento específico (TCE) =  $(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \times 100 / (\text{dias})$ ;
- Eficiência alimentar (EA) =  $100 \times [\text{ganho de peso (g)} / \text{quantidade de ração ingerida (g)}]$ ;
- Fator relativo de condição, segundo método preconizado por Le Cren [17];
- Índice hepatossômático (%):  $\text{peso do fígado (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100$ ;
- Índice viscerossômático (%):  $\text{peso das vísceras (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100$ .

## 2.6. Parâmetros sanguíneos e atividade respiratória de leucócitos

Após os 30 dias de alimentação com as dietas contendo 0, 4, 8 e 12 g/kg de extrato de *M. alliacea*, 4 peixes de cada repetição dos tratamentos (12 peixes por tratamento) foram usados para coleta de sangue por punção do vaso caudal, com o auxílio de seringas contendo heparina sódica ( $5000 \text{ UI.mL}^{-1}$ ). O sangue foi dividido em duas alíquotas. Uma parte do sangue foi usada para a determinação do hematócrito pelo método do microhematócrito, contagem de eritrócitos totais em câmara de Neubauer e concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina. Com esses dados foram calculados os índices hematimétricos de Wintrobe: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). As extensões sanguíneas foram confeccionadas e corada pancromicamente com uma combinação de May Grünwald-Giemsa-Wright, para contagem diferencial de leucócitos em até 200 células de interesse, em cada extensão. Essas extensões sanguíneas foram

também usadas para determinação do número de leucócitos e trombócitos totais [18]. A identificação e nomenclatura das populações de leucócitos seguiram as recomendações de Tavares-Dias et al. [19].

A atividade do burst respiratório foi determinada de acordo com o método de Biller-Takahashi et al. [20]. Resumidamente, 100 µL de sangue heparinizado foram adicionados a 100 µL de solução de nitroblue tetrazólio a 0,2% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e a solução final foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25 °C. Após a incubação e uma segunda homogeneização, 50 µL da solução foram adicionados a 1 ml de N, N-dimetilformamida (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Esta solução foi então homogeneizada e centrifugada a 3000 g durante 5 min. A densidade óptica (DO) da solução foi determinada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Curitiba, Brasil) a 540 nm.

A segunda aliquota de sangue foi centrifugada a 75 G, durante 5 minutos (Mod. 5424, Hamburgo, Alemanha) para obtenção do plasma e determinação da concentração dos níveis de glicose, proteína totais, albumina, colesterol e triglicerídeos utilizando kits colorimétricos (Biotécnica, MG, Brasil), com leituras de absorvência realizadas em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Curitiba, Brasil). As concentrações de globulina foram determinadas a partir da diferença dos níveis de proteína total e albumina.

## **2.7. Desafio com inoculação de *Aeromonas hydrophilla* e estresse de manejo**

Aos 30 dias de suplementação 0,4,8, e 12g *M. alliaea*/kg outros quatro peixes de cada réplica (4 peixes / tratamento) foram desafiados com *Aeromonas hydrophilla* (ATCC: 7966). Os peixes foram inoculados por via intraperitoneal com  $1,8 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, a concentração letal (CL<sub>50-96h</sub>) para *A. gigas* [21]. A mortalidade e sinais clínicos de bacteriose foram observados durante 7 dias, após esse período, os peixes sobreviventes foram submetidos a estresse de manejo durante 60 segundo [22-23]. Após seis horas de estresse de manejo e desafio com *A. hydrophilla*, foi coletado uma amostra de sangue de cada peixe como mencionado anteriormente e dividido em duas alíquotas para determinação de hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos totais, trombócitos, leucócitos e atividade respiratória de leucócitos, níveis de glicose, proteínas totais, albumina, colesterol, triglicérides e globulinas, conforme descrito no item 2.6.

## **2.8. Análises estatísticas**

Todos os dados foram previamente avaliados nos pressupostos de normalidade e homocedasticidade usando Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Como os dados mostraram uma distribuição normal foi usado análise de variância (ANOVA - One Way)

seguido do teste de Tukey, para comparação entre médias. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para avaliar as diferenças entre as medianas [24].

### 3. Resultados

Após 30 dias de suplementação com 8 g/kg de *M. alliacea*, houve aumento ( $p<0.05$ ) no peso final, biomassa final, ganho de peso diário, taxa de crescimento específico e eficiência alimentar quando comparados aos controles, enquanto os demais parâmetros de desempenho de crescimento não foram alterados ( $p>0.05$ ) pelas dietas (Tabela 2).

Em *A. gigas* suplementados com 8 g/kg de extrato de *M. alliacea* os níveis plasmáticos glicose, triglicerídeos, proteínas totais e globulinas aumentaram ( $p<0.05$ ) quando comparados aos controles, enquanto os níveis de albumina diminuíram ( $p<0.05$ ). A suplementação com 8 e 12 g/kg de extrato de *M. alliacea* aumentou ( $p<0.05$ ) o número de trombócitos totais quando comparado aos controles. Porém, dietas com extrato de *M. alliacea* não alterou colesterol, hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, VCM, CHCM, número de leucócitos e burst respiratório de leucócitos após os 30 dias de alimentação (Table 3).

Após 30 dias de alimentação com extrato de *M. alliacea* e desafio com *A. hydrophilla* e estresse de manejo, não houve qualquer mortalidade de peixes ou sinais clínicos de bacteriose. Os peixes suplementados com 8 g/kg de extrato de *M. alliacea* e desafiados, mostraram aumento ( $p<0.05$ ) nos níveis de glicose, globulina e albumina, enquanto os peixes suplementados com 8 e 12 g/kg tiveram aumento ( $p<0.05$ ) no burst respiratório de leucócitos quando comparados demais tratamentos. Os níveis de triglicerídeos plasmáticos foram reduzidos nos peixes suplementados com 4, 8 e 12 g/kg de extrato de *M. alliacea*, enquanto o número de neutrófilos aumentou ( $p<0.05$ ). O número de trombócitos totais, leucócitos totais e linfócitos também aumentou ( $p<0.05$ ) nos peixes suplementados com 12 g/kg de *M. alliacea* (Tabela 4).

**Tabela 2.** Parâmetros corporais e desempenho zootécnico de *Arapaima gigas* suplementados durante 30 dias com extrato de *Mansoa alliacea*.

Parâmetros	Concentrações das dietas			
	0 g/kg (n=24)	4 g/kg (n=24)	8 g/kg (n=24)	12 g/kg (n=24)
Comprimento inicial (cm)	26.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	25.6 ± 1.5 <sup>a</sup>	24.8 ± 5.1 <sup>a</sup>	25.1 ± 1.2 <sup>a</sup>
Peso inicial (g)	126.4 ± 16.9 <sup>a</sup>	124.6 ± 18.4 <sup>a</sup>	129.3 ± 22.6 <sup>a</sup>	123.1 ± 21.1 <sup>a</sup>
Comprimento final (cm)	37.7 ± 2.8 <sup>a</sup>	37.4 ± 2.5 <sup>a</sup>	38.9 ± 3.8 <sup>a</sup>	37.0 ± 2.8 <sup>a</sup>
Peso Final (g)	302.9 ± 98.9 <sup>a</sup>	288.9 ± 73.8 <sup>a</sup>	358.9 ± 89.0 <sup>b</sup>	280.5 ± 91.9 <sup>a</sup>
Biomassa Final (kg/m <sup>3</sup> )	30.3 ± 4.3 <sup>a</sup>	28.9 ± 3.1 <sup>a</sup>	37.7 ± 1.0 <sup>b</sup>	27.4 ± 2.4 <sup>a</sup>
Ganho de Peso diário (g)	5.9 ± 3.4 <sup>a</sup>	5.5 ± 2.5 <sup>a</sup>	7.5 ± 2.9 <sup>b</sup>	5.6 ± 3.0 <sup>a</sup>
Ganho de Peso (g)	176.5 ± 101.3 <sup>a</sup>	164.3 ± 74.0 <sup>a</sup>	227.6 ± 86.4 <sup>b</sup>	167.4 ± 89.0 <sup>a</sup>
Consumo diário de ração (g)	70.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	71.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	72.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	71.8 ± 1.3 <sup>a</sup>
CAA	1.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.6 ± .07 <sup>a</sup>
TCE	2.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	2.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	3.5 ± 1.1 <sup>b</sup>	2.8 ± 1.0 <sup>a</sup>
Eficiência alimentar (%)	66.6 ± 17.5 <sup>a</sup>	61.7 ± 11.9 <sup>a</sup>	94.6 ± 3.8 <sup>b</sup>	61.1 ± 2.3 <sup>a</sup>
Fator de condição (Kn)	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>
IHS (%)	2.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.5 <sup>a</sup>
VSI (%)	9.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	9.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	9.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	10.4 ± 1.6 <sup>a</sup>

Valores expressam média ± desvio padrão. IHS: Índice hepatossomático, IVS: Índice viscerossomático, CAA: Conversão alimentar aparente, TCE: Taxa crescimento específico. Valores seguidos de letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p<0.05).

**Tabela 3.** Parâmetros sanguíneos e imunológicos de *Arapaima gigas* suplementados durante 30 dias de dieta com extrato *Mansoa alliacea*

Parâmetros	Concentrações das dietas			
	0 g/kg (n=12)	4 g/kg (n=12)	8 g/kg (n=12)	12 g/kg (n=12)
Glicose (mg/dL)	32.1 ± 18.5 <sup>a</sup>	37.3 ± 15.7 <sup>a</sup>	74.2 ± 29.1 <sup>b</sup>	33.6 ± 16.4 <sup>a</sup>
Colesterol total (mg/dL)	109.7 ± 26.3 <sup>a</sup>	129.4 ± 32.2 <sup>a</sup>	144.8 ± 46.1 <sup>a</sup>	144.9 ± 22.6 <sup>a</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	152.5 ± 48.9 <sup>a</sup>	144.8 ± 27.6 <sup>a</sup>	236.4 ± 76.0 <sup>b</sup>	128.5 ± 50.6 <sup>a</sup>
Proteínas Totais (mg/dL)	2.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.2 ± 4.5 <sup>b</sup>	3.5 ± 1.0 <sup>a</sup>
Albumina (g/dL)	1.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.4 <sup>a</sup>
Globulinas (mg/dL)	1.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.7 ± 4.4 <sup>b</sup>	2.2 ± 1.0 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	28.8 ± 1.8 <sup>a</sup>	28.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	30.1 ± 1.7 <sup>a</sup>	27.6 ± 2.0 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	4.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.8 <sup>a</sup>
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> µL)	2.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.4 ± 1.0 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.6 <sup>a</sup>
VCM (fL)	143.2 ± 36.7 <sup>a</sup>	142.9 ± 33.4 <sup>a</sup>	155.4 ± 79.9 <sup>a</sup>	129.3 ± 25.0 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	15.3 ± 2.4 <sup>a</sup>	16.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	16.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	16.9 ± 3.1 <sup>a</sup>
Burst respiratório	0.19 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>
Trombócitos (µL)	29.943 ± 10.842 <sup>a</sup>	44.453 ± 17.456 <sup>a,b</sup>	49.084 ± 25.429 <sup>b</sup>	52.581 ± 15.614 <sup>b</sup>
Leucócitos (µL)	237.888 ± 77.988 <sup>a</sup>	254.960 ± 78.130 <sup>a</sup>	288.280 ± 94.880 <sup>a</sup>	276.862 ± 70.488 <sup>a</sup>
Linfócitos (µL)	114.247 ± 26.489 <sup>a</sup>	124.762 ± 49.463 <sup>a</sup>	164.402 ± 82.833 <sup>a</sup>	155.906 ± 38.381 <sup>a</sup>
Monócitos (µL)	8.076 ± 5.425 <sup>a</sup>	6.152 ± 3.860 <sup>a</sup>	11.149 ± 9.279 <sup>a</sup>	12.454 ± 8.168 <sup>a</sup>
Neutrófilos (µL)	112.600 ± 53,801 <sup>a</sup>	119.571 ± 34.734 <sup>a</sup>	109.440 ± 44.422 <sup>a</sup>	102.079 ± 29.598 <sup>a</sup>
Eosinófilos (µL)	2.965 ± 2683 <sup>a</sup>	4.475 ± 2.716 <sup>a</sup>	3.289 ± 2.168 <sup>a</sup>	6.423 ± 7.382 <sup>a</sup>

Valores expressam média ± desvio padrão. VCM: Volume corpuscular médio, CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Dunn (p<0,05).

**Tabela 4.** Parâmetros sanguíneos e imunológicos de *Arapaima gigas* suplementados durante 30 dias de dieta com extrato *Mansoa alliacea*, após desafio bacteriano e estresse de manejo.

Parâmetros	Concentrações das dietas			
	0 g/kg (n=12)	4 g/kg (n=12)	8 g/kg (n=12)	12 g/kg (n=12)
IHS (%)	1.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.5 <sup>a</sup>
IES (%)	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
Glicose (mg/dL)	38.3 ± 9.2 <sup>a</sup>	49.4 ± 19.5 <sup>a</sup>	113.7 ± 26.0 <sup>b</sup>	78.4 ± 13.4 <sup>a</sup>
Proteínas Totais (mg/dL)	3.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	4.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	3.1 ± 1.0 <sup>a</sup>
Colesterol total (mg/dL)	155.4 ± 37.2 <sup>a</sup>	167.4 ± 27.8 <sup>a</sup>	199.1 ± 76.5 <sup>a</sup>	156.2 ± 29.8 <sup>a</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	135.0 ± 60.1 <sup>a</sup>	66.7 ± 29.4 <sup>b</sup>	64.8 ± 26.8 <sup>b</sup>	67.9 ± 19.0 <sup>b</sup>
Albumina (g/dL)	1.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>a</sup>
Globulinas (mg/dL)	2.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	2.1 ± 1.0 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	33.6 ± 2.2 <sup>a</sup>	33.7 ± 2.6 <sup>a</sup>	29.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	29.8 ± 1.5 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	5.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	5.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	4.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	5.7 ± 1.0 <sup>a</sup>
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> µL)	1.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>a</sup>
VCM (fL)	270.3 ± 79.6 <sup>a</sup>	218.2 ± 68.4 <sup>a</sup>	196.7 ± 75.0 <sup>a</sup>	133.6 ± 23.8 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	16.8 ± 2.9 <sup>a</sup>	17.7 ± 4.4 <sup>a</sup>	16.9 ± 3.9 <sup>a</sup>	19.1 ± 3.5 <sup>a</sup>
Burst respiratório	0.15 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.04 <sup>b</sup>
Trombócitos (µL)	26.248 ± 9940 <sup>a</sup>	31.940 ± 10.799 <sup>a</sup>	36.644 ± 13.447 <sup>a</sup>	63.717 ± 14.582 <sup>b</sup>
Leucócitos (µL)	162.518 ± 53,532 <sup>a</sup>	197.018 ± 47.234 <sup>a</sup>	192.415 ± 67.473 <sup>a</sup>	290.780 ± 39.291 <sup>b</sup>
Linfócitos (µL)	106.268 ± 35,625 <sup>a</sup>	129.433 ± 32.949 <sup>a</sup>	120.208 ± 46.977 <sup>a</sup>	186.000 ± 28.690 <sup>b</sup>
Monócitos (µL)	6.564 ± 3.484 <sup>a</sup>	8.282 ± 4.607 <sup>a</sup>	9.045 ± 3.944 <sup>a</sup>	15.360 ± 6.122 <sup>a</sup>
Neutrófilos (µL)	47.587 ± 18.933 <sup>a</sup>	57.023 ± 21.898 <sup>b</sup>	59.479 ± 28.780 <sup>b</sup>	85.175 ± 37.915 <sup>b</sup>
Eosinófilos (µL)	2.099 ± 1.674 <sup>a</sup>	2.280 ± 2.582 <sup>a</sup>	3.683 ± 2.797 <sup>a</sup>	4.245 ± 4.494 <sup>a</sup>

Valores expressão média ± desvio padrão. VCM: Volume corpuscular médio, CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média. IHS: Índice hepatossomático, IES: Índice esplenossomático. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Dunn (p<0,05).

#### 4. Discussão

O uso de plantas medicinais em dietas práticas para peixes tornou-se um conceito muito atual na aquicultura [2-8,10-11], pois muitas plantas são fontes ricas de compostos bioativos com propriedades anti-stress, promoção de crescimento, estimulação do apetite e aumento das enzimas digestivas e pancreáticas em peixes suplementados [7]. A terapia herbal pode, portanto, ter melhores resultados que vários antibióticos e quimioterápicos usados no controle de doenças. *Mansoa alliacea* tem como principais compostos majoritários: flavonóides, terpenos, taninos, naphthoquinones, alcalóides, cumarinas, saponinas, ácido p-coumarico, ácido ferulici, lapachol, alliin allyl sulfides resveratrol, alicina e allina [1,13-14]. A alicina é um composto que induz ao aumento no consumo de ração, enquanto terpenos e cumarinas são reguladores de crescimento. A atividade antimicrobiana atribuída a diversas plantas pode estar relacionada à presença de alcalóides, taninos e flavonóides em sua composição [1]. Porém, até o momento, nada se sabia sobre o uso de *M. alliacea* na dieta de peixes. Este primeiro estudo com *M. Alliacea* mostrou que 8 g/kg de *M. alliacea* na dieta de *A. gigas* melhorou o peso final, biomassa final, ganho de peso diário, taxa de crescimento específico e eficiência alimentar dos peixes. Similarmente, suplementação na dieta de *Oncorhynchus mykiss* com 0.5, 1, 5 e 10 g/kg de *A. sativum* melhorou o ganho de peso, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica [15]. O peso e taxa de crescimento específico foram melhorados após alimentação de *H. huso* com dietas contendo 0.5 e 1% de *A. cepa* melhou [3] e de *Salmo trutta caspius* com dietas contendo óleo essencial de *M. piperita* [4]. Em contraste a suplementação com 0.1 e 0.5% de *N. Sativa* reduziu o ganho de peso e a taxa de crescimento específico de *O. mykiss* [6], enquanto suplementação com *C. coggyria* [2] e *Z. officinale* [10] não influenciou no crescimento dos peixes. Portanto, esses resultados indicam que compostos bioativos dessas plantas medicinais estimulam o processo digestivo dos peixes, incrementando assim a eficiência alimentar e crescimento dos animais suplementados.

A produção de peixes é um recurso importante no mundo para atender às necessidades de segurança alimentar e nutricional de uma população humana em rápido crescimento. As condições dos peixes no cultivo devem monitoradas para controlar a disseminação de doenças e estresse que impactam negativamente o desenvolvimento deste setor produtivo. Parâmetros sanguíneos como eritrócitos e leucócitos podem ser indicadores importantes para monitorar a saúde dos peixes em resposta à nutrição, doenças e estresse no cultivo [5, 15, 17]. Além disso, outros parâmetros podem ser também avaliados. Níveis elevados de proteínas totais e globulinas tem sido associados a uma forte resposta da imunidade inata nos peixes [3]. Em *A.gigas*, suplementação peixes com extrato de *M. alliacea* não influenciou os parâmetros



eritrocitários e leucócitos; mas 8 g/kg de extrato de *M. alliacea* aumentaram os níveis plasmáticos glicose, triglicerídeos, proteínas totais e globulinas e reduziu os níveis de albumina. Além disso, suplementação com 8 e 12 g/kg de extrato de *M. alliacea* aumentou o número de trombócitos totais. Porém, suplementação com *A. cepa* reduziu os níveis de glicose, proteína total, triglicerídeos, colesterol, albumina e globulinas, mas aumentou o hematócrito e número de eritrócitos e leucócitos de *H. huso* [3]. Em *O. mykiss* suplementados com *A. sativum*, os parâmetros de eritrócitos e leucócitos aumentaram de acordo com as concentrações usadas, exceto a hemoglobina e número de trombócitos [15]. Em contraste, suplementação com *A. sativum* não influenciou nos níveis de glicose, proteínas totais e parâmetros eritrocitários de *Colossoma macropomum*, mas reduziu o número de leucócitos, linfócitos e neutrófilos [5]. Portanto, como a suplementação de *M. alliacea* causou aumento dos níveis de triglicerídeos e glicose plasmáticos em *A. gigas*, essa planta parece ter efeitos hiperlipidêmico e hiperglicêmico, isso precisa ser melhor investigado.

*Arapaima gigas*, um peixe importante economicamente para aquicultura da Amazônia, sofre frequentemente com problemas de bacterioses na fase de alevinagem [12, 21], devido ao estresse inerente ao manejo, necessitando, portanto de medidas profiláticas para desenvolvimento de sua produção intensiva. *Mansoa alliacea*, possui largo espectro no tratamento de várias enfermidades devido a presença de cumarinas e compostos fenólicos, que auxiliam na liberação de histamina que tem atividade antiinflamatória e antimicrobiana [1, 13]; além disso, possui compostos bioativos com propriedades de imunoestimulação. Em *A. gigas* suplementados com 8 g/kg de *M. alliacea* e desafiados com *A. hydrophilla* e estresse de manejo, ocorreu aumento nos níveis de glicose, albumina, globulinas, burst respiratório de leucócitos e número de neutrófilos. A suplementação com 12 g/kg de *M. alliacea* aumentou o burst respiratório de leucócitos, número de trombócitos, leucócitos totais e linfócitos em *A. gigas*. Portanto, este aumento no burst respiratório de *A. gigas* é um indicativo de aumento nos mecanismos de defesa contra infecções bacterianas, devido ao incremento da atividade fagocítica dos peixes [2,20]. Além disso, como as globulinas são responsáveis pela defesa do organismo [3, 25], esse aumento dos níveis de globulina em *A. gigas* indica um aumento da proteção imune contra *A. hydrophilla*.

## 5. Conclusões

Este primeiro estudo sobre uso de *M. alliacea* na aquicultura mostra efeitos benéficos em vários parâmetros de desempenho de crescimento e imunidade inata de *A. gigas*. Portanto, suplementação com 8 g/kg de *M. alliacea* na dieta de alevinos de *A. gigas*, durante longo

período, pode ser recomendado para melhoria no crescimento e resistência imune na aquicultura intensiva deste peixe amazônico.

### **Agradecimentos**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pelo financiamento deste projeto (Pró-Amazônia -nº 230238.00754/2013-61) e bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor. Os autores também agradecem Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) pela Bolsa de Produtividade concedida ao Dr. M. Tavares-Dias (# 303013 / 2015-0) e pelo Sr. Carlos Alberto Moraes (Embrapa) pela coleta de amostras de *Mansoa alliacea*.

### **Referencias**

- [1] F.B. Pires, C.B. Dolwitsch, V.D. Prá, D.L. Monego, V.M. Schneider, R.F. Loose, M.E.P. Schmidt, L.P. Bressan, M.A. Mazutti, M.B. Rosa, An Overview About The Chemical Composition And Biological Activity Of Medicinal Species Found In the Brazilian Amazon. *J. appl. pharm. sci.* 6 (2016) 233-238.
- [2] S. Bilen, M. Bulut, A.M. Bilen, Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish Shellfish Immunol.* 30 (2011) 451- 455.
- [3] R. Akrami, A. Gharaei, M. Razeghi, A. Galeshi, Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hematoebiochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile, *Fish Shellfish Immunol.* 45 (2015) 828–834.
- [4] M. Adel, R. Safari, R. Pourgholam, J. Zorriehzahra, M.A. Esteban, Dietary peppermint (*Mentha piperita*) extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters (both at mucosal and systemic level) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish Shellfish Immunol.* 47 (2015) 623–629.
- [5] B.L.A. Inoue, K.A.P.O. Maciel, E.G. Affonso, C.L., Boijink, M. Tavares-Dias, Growth, parasitic infection and hematology in *Collossoma macropomum* Cuvier, 1818 fed diets containing *Allium sativum*, *J. Appl. Ichthyol.* 32 (2016) 901–905.
- [6] Y.C. Altunoglu, S. Bilen, F. Ulu, G. Biswas, Immune responses to methanolic extract of black cumin (*Nigella sativa*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish Shellfish Immunol.* 67 (2017) 103–109.
- [7] S.R. Shakya, Effect of herbs and herbal products feed supplements on growth in fishes: a review. *Nepal J Biotechnol.* 5 (2017) 58-63.
- [8] K.S. Moghanlou, E.N. Isfahani, S. Dorafshan, A. Tukmechi, M.S. Aramli, Effects of dietary supplementation with *Stachys lavandulifolia* Vahl extract on growth performance, hemato-

- biochemical and innate immunity parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim. Feed Sci. Technol. 237 (2018) 98–105.
- [9] B.S. Sahu, B.K. Das, B.K. Mishra, J. Pradhan, N. Sarangi. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophilla*, J. Appl. Ichthyol. 23 (2007) 80–86.
- [10] H.G. Kanani, Z. Nobahar, S. Kakoolaki, H. Jafarian, Effect of ginger and garlic supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. Fish Physiol Biochem. 40 (2014) 481-490.
- [11] S.H. Hoseinifar, H.Z. Khodadadian, H.K. Miandare, H.V. Doan, N. Romano, M., Dadar, Enrichment of common carp (*Cyprinus carpio*) diet with medlar (*Mespilus germanica*) leaf extract: effects on skin mucosal immunity and growth performance, Fish Shellfish Immunol. 67 (2017) 346–352.
- [12] A.A. Proietti-Junior, L.S. Lima, F.M.N. Cardoso, D.P. Rodrigues, M. Tavares-Dias, Bacterioses em alevinos de pirarucu de cultivo, com ênfase em Edwardsielose e Aeromonose. Comunicado Técnico 149. Macapá, Embrapa Amapá, 2017, pp. 9.
- [13] M.G.B. Zoghbi, J. Oliveira, G. M. Skelding, P. Guilhon, The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. Braz. J. Pharmacog. 19 (2009) 795-804.
- [14] A.M.P. Walag, A.B.M. Cepeda, A.S. Galenzoga, S.M.J. Sambaan, Initial phytochemical screening of the different parts of *Mansoa alliacea* L. (Garlic Vine). Int J Biosci. 11(2017) 227-231.
- [15] E.J. Nay, B. Austin, Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophilla* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis (2009) 32 963–970.
- [16] AOAC- Association of official analytical chemists, Official methods of analysis, 16<sup>th</sup> ed. Arlington, AOAC, 1995.
- [17] ED. Le Cren, The length–weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). J. Animal Ecol. 20 (1951) 201–219.
- [18] M.J.T. Ranzani-Paiva, S.B. Padua, M. Tavares-Dias, M.I. Egami, M.I., Métodos para análises hematológicas em peixes. Eduem: Maringá. 2013, 135p.
- [19] M. Tavares-Dias, J.F.M. Barcellos, J.L. Marcon, G.C. Menezes, E.A. Ono, E.G. Affonso. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822

- (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture. *Electron. J. Ichthyol.* 2 (2007) 61-68.
- [20] J.D. Biller-Takahashi, L.S. Takahashi, M.V. Saita, R.Y. Gimbo, E.C. Urbinati, Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*, *Braz. J. Biol.* 73 (2013a) 425-429.
- [21] M.K.R. Dias, L.S. Sampaio, A. Proietti-Junior, E.T.O. Yoshioka, D.P. Rodrigues, A.F.R. Rodriguez, R.A. Ribeiro, F.S.E.D.V. Farias, R.O.A. Ozório, Tavares-Dias, M. Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon, *Vet. Microbiol.* 188 (2016) 12–15.
- [22] B.A. Barton, R.E. Zitzow, Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water, *Prog. Fish-Cult.* 57 (1995) 267-276.
- [24] E.L. Davis, C.B. Schreck, The energetic response to handling stress in juvenile *coho salmo*, *Trans. Am. Fish. Soc.* 126 (1997), 248-258.
- [24] Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. 5<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice-Hall, p. 944.
- [25] J.D. Biller-Takahashi, L.S. Takahashi, F. Pilarski, F.A. Sebastião, E.C. Urbinati, Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65 (2013b) 1745-1751.

## CONCLUSÕES FINAIS

- Para *A. gigas*, a concentração letal (CL<sub>50-96h</sub>) de *A. hydrophila* foi elevada quando comparada com outras espécies da literatura, devido as características fisiológicas de cada espécie.
- Os imunoestimulantes Levabom<sup>®</sup> e Aquatefish<sup>®</sup>, ambos a base de *S. cerevisiae*, e extrato de *M. alliacea* influenciaram positivamente o desempenho de crescimento e os parâmetros fisiológicos e imunológicos de *A. gigas*.
- O imunoestimulante Levabom<sup>®</sup> reduziu os impactos do estresse de manejo na fisiologia de *A. gigas*.
- Os imunoestimulantes Aquatefish<sup>®</sup> e o extrato de *M. alliacea* melhoram a resistência de *A. gigas* contra infecção por *A. hydrophila*.
- Recomenda-se, portanto, a adição de 8 g/kg de Levabom<sup>®</sup> ou 8 g/kg de extrato de *M. alliacea* na dieta de *A. gigas*, para a promoção do crescimento e melhoria da imunidade inata dos peixes.
- Recomenda-se a adição de 12 g/kg de Aquatefish<sup>®</sup> na dieta de *A. gigas*, para a promoção do crescimento e melhoria da imunidade inata dos peixes.
- *Mansoa alliacea* têm potencial bioativo para uso na aquicultura, uma vez que possuem efeitos imunoestimulantes em peixes.
- Extrato de *M. alliacea* e Aquatefish<sup>®</sup> foram os imunoestimulantes com melhores resultados para alevinos de *A. gigas*.