



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



Lígia Carvalho Dias Oliveira

**Eficácia *in vitro* de anti-helmínticos contra *Neoechinorhynchus buttnerae*
(Acanthocephala) e toxicidade em *Collossoma macropomum***

Macapá, AP

2019

LÍGIA CARVALHO DIAS OLIVEIRA

**EFICÁCIA *IN VITRO* DE ANTI-HELMÍNTICOS CONTRA
Neoechinorhynchus buttnerae (ACANTHOCEPHALA) E TOXICIDADE
EM *Colossoma macropomum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Dr. Marcos Tavares Dias

Macapá, AP

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

Elaborada por Cristina Fernandes – CRB2/1569

Oliveira, Lígia Carvalho Dias.

Eficácia *in vitro* de anti-helmínticos contra *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) e toxicidade em *Colossoma macropomum*. / Lígia Carvalho Dias Oliveira ; Orientador, Marcos Tavares Dias. – 2019.

66 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

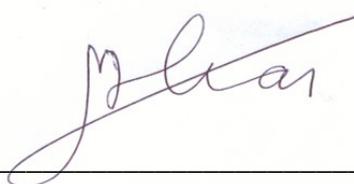
1. Antiparasitários. 2. Hematologia. 3. Parasitos. 4. Acanthocephala. 5. Tambaqui. I. Dias, Marcos Tavares, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

639.4 O48e

CDD. 22 ed.

LÍGIA CARVALHO DIAS OLIVEIRA

EFICÁCIA *IN VITRO* DE ANTI-HELMÍNTICOS CONTRA
Neoechinorhynchus buttnerae (ACANTHOCEPHALA) E TOXICIDADE EM
Colossoma macropomum



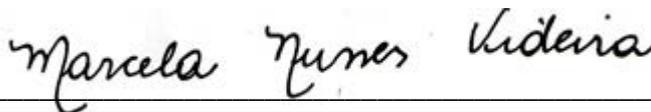
Dr. Marcos Tavares Dias (Orientador)

Embrapa Amapá/PPGBIO



Dr. Lucio André Viana Dias

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP/PPGBIO)



Dra. Marcela Nunes Videira

Universidade do Estado do Amapá (UEAP)

Aprovado em 22 de fevereiro de 2019, Macapá, AP, Brasil.

A Iaci de Nazaré de Carvalho Dias, pelo
privilégio de ter sido sua neta.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Marcos Tavares Dias, pois foi uma honra ser orientada por um profissional excepcional como você. Muito obrigada pela paciência e compreensão nos dias difíceis. Aprender com o senhor foi um dos melhores acontecimentos nos últimos dois anos.

Agradeço a Embrapa Amapá e UNIFAP, que me acolheram durante dois anos e me apoiaram com toda a estrutura necessária para que essa pesquisa fosse concluída.

A Dra Edsandra Campos Chagas, pelo acolhimento na cidade de Manaus e a todos do Laboratório de Piscicultura na Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus), em particular a Cláudia Majolo. Eu definitivamente não conseguiria sem vocês. Obrigada pelo aprendizado e carinho.

Ao PPGBIO, as disciplinas realizadas tiveram grande importância no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada pela organização e compreensão nos momentos que eu não consegui estar presente. Entrar e sair desse programa de pós-graduação foi um dos maiores desafios que eu consegui realizar.

Aos amigos do Laboratório de Sanidade de Organismo Aquáticos da Embrapa Amapá, pelo apoio nos dias longos de experimento. Especialmente a Jozielle Neves, pelo companheirismo e auxílio em uma noite chuvosa, pois foi o exemplo mais bonito de empatia que pude viver nesse ano.

Aos queridíssimos Seguidores de Gaia: Yuri Silva, Raimundo Baia, Hélio Pamphylío e Tiago Costa. Obrigada por todo incentivo e ensinamento, vocês são incríveis!

Aos colegas da turma do PPGBIO/2017, pela troca de aprendizados, desafios das disciplinas e companheirismo em sala de aula. Em especial, a Jéssica Vilhena, Brunna Sangel e Saulo Meneses.

A Carmem Laura, por pagar minha inscrição do processo seletivo do PPGBIO e por me incentivar a não desistir. Obrigada por se alegrar com as minhas alegrias e conquistas. Eterna gratidão por tudo!

Ao Murillo, por me acompanhar desde a formatura, por ser o primeiro a ouvir sobre o meu desejo de entrar no PPGBIO, por me esperar sair da aula para eu não voltar sozinha para casa, por ouvir meus ensaios das apresentações atenciosamente, mesmo sem entender o assunto, e por ser meu ajudante de laboratório. Enfim, por não ter saído do meu lado mesmo quando já era difícil demais. De todo meu coração, obrigada!

Ao meu maior incentivador da vida, meu tio e meu amigo Luíz Carlos de Carvalho Dias. Sem a cópia do livro do Begon, eu não teria conseguido. Muito obrigada por não medir esforços para realizar os meus sonhos.

Ao meu tio Janio por cuidar de mim como filha, me apoiar e comemorar minhas conquistas!

A minha família de Belém, em especial Ivone, Ana e Carol. O incentivo dado de longe é sentido aqui. Não é fácil estar longe, obrigada por toda torcida.

Aos que partiram e deixaram grandes ensinamentos, Iaci, Manoel e Landoaldo de Carvalho Dias e Ilana Pereira. A saudade é grande, obrigada pelo cuidado e amor dedicado a mim enquanto viveram.

Ao meu amor maior, minha família, Lêda, José e Louise. Obrigada por entenderem minha ausência e o meu silêncio. Por acordarem de madrugada para me levarem em Santana, pelas risadas no café da manhã, pelos abraços apertados quando me faltava coragem. Ter vocês como família é a melhor parte do meu dia.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

PREFÁCIO

Esta dissertação está dividida em três capítulos, sendo o primeiro a Introdução Geral, seguindo o formato alternativo proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO). O artigo 1 é intitulado “**Avermectins, praziquantel and levamisole have *in vitro* efficacy against *Neoechinorhynchus buttnerae* (Neoechinorhynchidae) in *Colossoma macropomum*, a Serrasalminidae from the Amazon**”, aceito no periódico **Journal of Fish Diseases** (Qualis A2 - Biodiversidade), e segue as normas desse periódico (Anexo 1). O artigo 2 intitulado “**Efeitos da suplementação do levamisol e ivermectina na dieta de *Colossoma macropomum* (Pisces: Serassalminidae): toxicidade, hematologia e imunidade inata**” será submetido ao periódico **Diseases of Aquatic Organisms** (Qualis B1- Biodiversidade), e segue as normas desse periódico.

RESUMO

Oliveira, Lígia Carvalho Dias. Eficácia *in vitro* de anti-helmínticos contra *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) e toxicidade em *Colossoma macropomum*. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical), 2019. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá.

Este estudo investigou a eficácia *in vitro* do levamisol, praziquantel, loperamida, albendazol, febendazol, mebendazol, benzoato de emamectina e ivermectina em *Neoechinorhynchus buttnerae* de *Colossoma macropomum*, bem como a toxicidade, hematologia e imunidade inata desse peixe suplementado na dieta com levamisol e ivermectina. Loperamida, albendazol, febendazol, mebendazol foram ineficientes no tratamento *in vitro* contra *N. buttnerae*, enquanto benzoato de emamectina (100 mg/L), ivermectina (300 mg/L), levamisol (300, 350, 400, 450 mg/L) e praziquantel (2500-2700 mg/L) tiveram 100% de eficácia contra *N. buttnerae* dentro de 24 horas. Nos ensaios dos efeitos de toxicidade de ivermectina (4.500, 9.000, 13.500 e 18.000 mg/kg) e levamisol (300, 600, 900 e 1200 mg/kg) na dieta de *C. macropomum*, avaliados durante 24, 96 e 240 horas de tratamento, as concentrações de ivermectina causaram 100% de mortalidade dos peixes dentro de 10 horas, mas nenhuma concentração de levamisol causou mortalidade ou alteração no comportamento dos peixes dentro de 10 dias de alimentação. Não houve alteração no número de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, CHCM e albumina em todos os tratamentos com levamisol, após 24, 96 e 240 h de alimentação. Porém, após 24 h o VCM dos peixes que receberam 900 mg/kg aumentou em relação aos controles. Além disso, as concentrações de 900 e 1.200 mg/kg causaram diminuição nas taxas de albumina: globulina quando comparadas aos controles e tratamentos com 300 e 600 mg/kg e os níveis de glicose e proteína total plasmática aumentaram nos peixes alimentados com 600, 900 e 1200 mg/kg quando comparados aos controles e tratamento com 300 mg/kg. Após 10 dias de alimentação com levamisol, houve aumento nos níveis de globulina dos peixes que receberam 600 mg/kg quando comparados aos controles, e a atividade respiratória de leucócitos também aumentou nos peixes suplementados com 900 e 1.200 mg/kg quando comparados aos demais tratamentos. Altas concentrações de ivermectina na dieta de *C. macropomum* não são toleradas, mas de levamisol são bem toleradas. Este primeiro estudo sobre alimentação com estes fármacos forneceu informações importantes sobre a efetividade do levamisol no sistema imune inato e indica que qualquer uma das concentrações testadas pode ser usada na dieta de *C. macropomum* para tratamentos antiparasitários.

Palavras-chave: antiparasitários, hematologia, parasitos, Acanthocephala, tambaqui.

ABSTRACT

Oliveira, Lígia Carvalho Dias. *In vitro* efficacy of anthelmintics against *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) and toxicity on *Colossoma macropomum*. Dissertation of Master in Tropical Biodiversity, 2019. Postgraduate Program in Tropical Biodiversity, Federal University of Amapá.

This study investigated the *in vitro* efficacy of levamisole, praziquantel, loperamide, albendazole, fenbendazole, mebendazole, emamectin benzoate and ivermectin in *Neoechinorhynchus buttnerae* of *Colossoma macropomum*, as well as the toxicity, hematology and innate immunity in fish supplemented in diet with levamisole and ivermectin. Loperamide, albendazole, fenbendazole, mebendazole were ineffective in the *in vitro* treatment against *N. buttnerae*, while emamectin benzoate (100 mg/L), ivermectin (300 mg/L), levamisole (300, 350, 400, 450 mg/L) and praziquantel (2500-2700 mg/L) had 100% efficacy against *N. buttnerae* within 24 h. In the trials of toxicity effects of ivermectin (4500, 9000, 13.500 and 18.000 mg/kg) and levamisole (300, 600, 900 and 1200 mg / kg) on the diet of *C. macropomum*, evaluated during 24, 96 and 240 h of treatment, the ivermectin concentrations caused 100% fish mortality within 10 h, but no concentration of levamisole caused mortality or alteration in fish behavior within 10 days of supplementation. There was no change in the number of erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, CHCM and albumin in all treatments with levamisole after 24, 96 and 240 h of feed. However, after 24 h, the MCV of the fish that received 900 mg/kg increased when compared to the controls. In addition, concentrations of 900 and 1200 mg /kg caused a decrease in albumin: globulin ratio when compared to controls and treatments at 300 and 600 mg/kg, and plasma glucose and total protein levels increased in fish fed 600, 900 and 1200 mg/kg when compared to controls and 300 mg/kg. After 10 days of feeding with levamisole, there was an increase in the globulin levels of fish that received 600 mg/kg of levamisole when compared to the controls, and the leukocyte respiratory activity also increased in fish supplemented with 900 and 1200 mg/kg when compared to the other treatments. High concentrations of ivermectin in the diet of *C. macropomum* are not tolerated, but levamisole are well tolerated. This first study on diet with these drugs provided important information on the effectiveness of levamisole in the innate immune system and indicates that any of the concentrations tested may be used in the diet of *C. macropomum* for antiparasitic treatments.

Keywords: antiparasitics, hematology, parasites, Acanthocephala, tambaqui.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 O TAMBAQUI <i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i>.....	13
1.2 <i>NEOECHINORHYNCHUS BUTTNERAE</i>.....	13
1.3 O USO DE ANTI-HELMÍNTICOS QUÍMICOS EM PEIXES.....	15
1.4 TOXICIDADE DA IVERMECTINA E LEVAMISOL EM PEIXES.....	20
2. PROBLEMA.....	23
3. HIPÓTESES.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. GERAL	23
4.2. ESPECÍFICO	23
5. REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL.....	24
ARTIGO 1.....	32
ARTIGO 2.....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
ANEXO - ARTIGOS PUBLICADOS	64

1. Introdução Geral

A sociedade mundial enfrenta o enorme desafio de fornecer alimentos e meios de subsistência para uma população que excede 7 bilhões de pessoas, ao mesmo tempo em que há impactos das mudanças climáticas e degradação ambiental afetando a produção de recursos alimentares. A aquicultura representa uma boa alternativa para a produção de alimentos. Em 2016, a produção total de peixe alcançou um recorde histórico de 171 milhões de toneladas, das quais 88% foram utilizadas para consumo do homem, graças à captura relativamente estável da produção pesqueira, redução de desperdício e crescimento continuado da aquicultura. Essa produção resultou em um consumo per capita recorde de 20,3 kg em 2016 (FAO, 2018).

O continente sul-americano é conhecido por sua alta produção e exportação da pesca e aquicultura, mas não atingiu todo o seu potencial na piscicultura. O Chile e Brasil são dois dos maiores produtores de peixes da América do Sul. O Chile produz principalmente peixes marinhos, enquanto o Brasil é importante para a produção continental, que tem o *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (tambaqui) como principal espécie nativa, devido as suas diversas características produtivas desejáveis (Valladão et al. 2018).

No Brasil, a criação de peixes de água doce é o único setor da aquicultura presente em todos os estados, representando quase 80% da produção total (Saint-Paul 2017) com valor da produção em torno de R\$ 3.5 milhões em 2016. Desta produção, a região Norte é responsável por 29,5%. O tambaqui representa 78,6% da piscicultura da região norte, com a produção nacional de quase 137 mil toneladas, representando 27% da produção total de peixes (IBGE, 2018). Essa produção é geralmente baseada em sistemas de cultivo intensivo, caracterizados pelas elevadas densidades de estocagem, onde os peixes ficam mais suscetíveis ao estresse e consequentemente as infecções parasitárias (Tavares-Dias et al. 2001, Chagas et al. 2016, Lourenço et al. 2017, Jerônimo et al. 2017).

Na última década, um dos principais problemas para o cultivo de tambaqui na região Norte tem sido as infecções por acantocéfalos *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956 (Malta et al. 2001, Chagas et al. 2016, Lourenço et al. 2017, Jerônimo et al. 2017, Matos et al. 2017; Lourenço et al. 2018). Altas cargas desse endoparasito podem afetar o crescimento do tambaqui, afetando assim a sua produção e produtividade e levando a perdas econômicas significativas (Silva-Gomes et al. 2017), devido a sua patogenicidade (Chagas et al. 2016, Jerônimo et al. 2017, Matos et al. 2017), necessitando, portanto, de controle antiparasitário para esse endoparasito. Estudos recentes estimam perdas econômicas de 84 milhões de dólares/ano devido as infecções parasitárias em peixes cultivados no Brasil (Tavares-Dias e Martins 2017).

Poucos estudos têm sido direcionados para avaliação da eficácia de anti-helmínticos comerciais no controle de acantocéfalos, bem como a toxicidade para os peixes (Taraschewski et al. 1990), incluindo o tambaqui. Portanto, há a eminente necessidade de estudos sobre tratamentos anti-helmínticos para controlar infecções de *N. buttnerae* em tambaqui, bem como sobre a toxicidade desses tratamentos para esse importante peixe amazônico.

1.1.O tambaqui *Colossoma macropomum*

O tambaqui, peixe da família Serrasalminidae, é considerado um dos maiores peixes de escamas de água doce da Amazônia, podendo pesar 30 kg e 1m de comprimento, quando em ambiente natural (Goulding e Carvalho 1982). Este peixe é nativo das bacias dos rios Orinoco e Amazonas e ocorre no Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia (Araújo-Lima e Goulding 1998, Saint-Paul 2017, Valladão et al. 2018). Assim, é a principal espécie cultivada na América Latina (Valladão et al. 2018).

Esse peixe apresenta excelentes características zootécnicas para a piscicultura (Saint-Paul 1991, Van der Meer 1997), tais como reprodução em cativeiro, aceitação de alimentos artificiais (ração), relativa resistência a doenças, ao manuseio e a baixa qualidade da água. Possui crescimento rápido, tolera altas densidades de estocagem, tem excelente aceitação no mercado nacional e bom rendimento de carcaça. Além disso, pode ser usado na aquariorfilia (Campos-Baca e Köhler 2013, Saint-Paul 2017).

Na região norte do Brasil, embora a produção de tambaqui não seja recente, os problemas com a disseminação de *N. buttnerae* tem cerca de 18 anos, quando foi registrado o primeiro caso de mortalidade de peixes (Malta et al., 2001). Porém, não há estudos sobre o controle antiparasitário disponíveis para esse acantocéfalo, bem como sobre toxicidade de anti-helmínticos químicos para tambaqui.

1.2.Acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*

Parasitas do filo Acanthocephala podem ser encontrados em meio terrestres e aquáticos marinhos e dulcícolas. Esses helmintos parasitam quase exclusivamente o intestino dos vertebrados e aderem-se aos hospedeiros usando uma probóscide espinhosa. Possuem ciclo de vida complexo que necessita de hospedeiros intermediários, que são, em geral, artrópodes crustáceos (anfípodes, copépodes, isópodes ou ostracodas) que vivem em ambiente aquático; ou coleópteros, caso o hospedeiro seja terrestre. Podem ter hospedeiros paratênicos (larvas de megaloptera e moluscos) e os hospedeiros definitivos são peixes, aves e mamíferos (Kennedy,

2006; Nickol, 2006). Os acantocéfalos adultos produzem grande quantidade de ovos que são ingeridos pelos hospedeiros intermediários, que compõem o zooplâncton, que por sua vez, são predados por vertebrados aquáticos como peixes, fechando assim o ciclo de vida do parasito, contaminando a água, o plâncton e os demais peixes adjacentes (Malta et al. 2001).

Diferentes espécies de acantocéfalos ocorrem em peixes da Amazônia (Thatcher, 2006), mas *N. buttnerae* da família Neoechinorhynchidae ocorre em tambaqui (Golvan, 1956, Malta et al. 2001, Matos et al 2017, Jerônimo et al. 2017) e seus híbridos tambatinga (*C. macropomum* x *Piaractus brachypomus*) e tambacu (*C. macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) (Silva et al. 2013, Dias et al. 2015). Este endoparasito tem ostracoides *Cypridopsis vidua* como hospedeiro intermediário (Lourenço et al., 2018) e o tambaqui como hospedeiro definitivo, sendo atualmente um grave problema para a piscicultura da região Norte do Brasil, devido a sua elevada carga que é frequente nos peixes cultivados (Jerônimo et al 2017, Matos et al. 2017), levando a alterações histopatológicas.

Em alevinos de tambaqui do estado do Amazonas cultivados em barragens, houve elevada mortalidade devido ao elevado parasitismo por *N. buttnerae*. A prevalência desse endoparasito foi de 100% e intensidade média de 125,3 parasitos por hospedeiro. A epizootia ocasionou oclusão do trato intestinal, prejudicando a capacidade de absorção de alimentos (Malta et al., 2001). Estudos recentes, em tambaquis de viveiro escavado de Rio Preto da Eva, no estado do Amazonas, relataram prevalência de 100% de *N. buttnerae* e intensidade média de 347,5 parasitos por hospedeiro (Lourenço et al. 2017). Em tambaquis de piscicultura do estado de Rondônia a prevalência também foi de 100% e intensidade média de 262 parasitos por hospedeiro (Jerônimo et al. 2017). No estado do Amapá também há relatos da infecção por *N. buttnerae* em tambaquis (Dias et al. 2015) e híbridos tambacu e tambatinga (Silva et al. 2013, Dias et al. 2015), mas em baixa carga parasitária quando comparado ao tambaqui.

Em tambaquis infectados por *N. buttnerae*, estudos histopatológicos mostraram diferentes graus de penetração da probóscide no tecido intestinal superando a mucosa, a submucosa e a camada muscular e com edema submucoso. Houve aumento no número de células caliciformes, metaplasia e uma notável redução das vilosidades intestinais (Jerônimo et al. 2017; Matos et al 2017, Aguiar et al. 2018). Conseqüentemente, em alta infecção por *N. buttnerae* os peixes apresentam crescimento mais lento e com as lesões causadas no intestino, estes peixes param de se alimentar culminando em morte (Malta et al. 2001). Estudos recentes mostraram que esses endoparasitos afetam o crescimento de tambaqui em 200%, podendo impactar a renda bruta da propriedade em mais de 1000% (Silva-Gomes et al 2017). Portanto, são necessárias estratégias de controle das infecções de *N. buttnerae* em tambaquis cultivados.

1.3.O uso de anti-helmínticos químicos em peixes

Em peixes, há duas formas de investigação da ação antiparasitária dos quimioterápicos: os ensaios *in vivo* e *in vitro*. A ação *in vitro* pode ser realizada usando placas de Petri ou tubos de ensaios. Os experimentos *in vivo* podem ser feitos usando banhos terapêuticos, quando o fármaco é acrescentado na água para matar ectoparasitos que comumente estão nas brânquias ou tegumento. Outra aplicação *in vivo* é usando o produto terapêutico na ração dos animais, principalmente para parasitos gastrointestinais (endoparasitos). Outro método pouco comum é a inoculação intravenosa dos agentes quimioterápicos, usado principalmente para peixes reprodutores de grande valor econômico. Em geral, é conduzida uma investigação previa, *in vitro*, das concentrações com eficácia para posterior aplicação do produtos quimioterápicos nos tratamentos *in vivo* (Sitjà-Bobadilla et al. 2006, Forwood et al. 2013, Chagas et al. 2016, Khalil et al. 2016). Estudos *in vitro* têm sido conduzidos para avaliar os efeitos de diferentes anti-helmínticos contra algumas espécies de helmintos parasitos em algumas espécies de peixes, e os resultados mostraram diferenças na eficácia das concentrações, na dependência do anti-helmíntico e tempo de exposição (Tabela 1).

Tabela 1. Eficácia *in vitro* de diferentes anti-helmínticos para diferentes espécies de helmintos parasitos de peixes.

Anti-helmínticos	Espécies de helmintos	Hospedeiros	Concentrações	Resultados	Referências
Albendazol	<i>Anisakis</i> spp.	<i>Micromesistius poutassou</i>	0,5 e 1 mg/mL	Sem eficácia	Romero et al (2014)
Benzoato de emamectina	<i>Acolpenteron ureteroecetes</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	50 mg/mL	Eficácia de 100% após 17 h	Reimschuessel et al (2011)
Febendazol	<i>Cardicola forsteri</i>	<i>Thunnus maccoyii</i>	10 µg/mL	Eficácia após 48 h	Hardy-Smith et al (2012)
	<i>Neoechinorhynchus rutili</i> e <i>Echinorhynchus truttae</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	500 µg/mL	Sem eficácia	Taraschewski et al (1990)
Ivermectina	<i>Acolpenteron ureteroecetes</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	100 mg/L	Eficácia de 77,7% após 17 h	Reimschuessel et al (2011)
	<i>Acolpenteron ureteroecetes</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	100 mg/L	Eficácia de 90,0% após 17 h	Reimschuessel et al (2011)
	<i>Heterobothrium okamotoi</i>	<i>Takifugu rubripes</i>	50 mL	Eficácia de 100% após 3 h	Hirazawa & Hata (2000)
Levamisol	<i>Neoechinorhynchus rutili</i> e <i>Echinorhynchus truttae</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	500 µg/mL	Eficácia após 1 h	Taraschewski et al (1990)
	<i>Diplozoon paradoxum</i>	<i>Squalius cephalus</i> e <i>Abramis brama</i>	20 e 50 µg/mL	Eficácia de 100% após 45 minutos	Schmahl & Taraschewski (1987)
Loperamida	<i>Neoechinorhynchus rutili</i> e <i>Echinorhynchus truttae</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	50 e 100 µg/mL	Eficácia após 60 e 30 minutos	Taraschewski et al (1990)
Mebendazol	<i>Dactylogyrus vastator</i>	<i>Carassius auratus</i>	0.02 e 0.04 mg/L	Eficácia de 46,9%	Zhang et al. (2014)
	<i>Acolpenteron ureteroecetes</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	100 mg/L	Sem eficácia	Reimschuessel et al (2011)
	<i>Heterobothrium okamotoi</i>	<i>Takifugu rubripes</i>	50 mL	Eficácia de 100% após 1h	Hirazawa & Hata (2000)
	<i>Cardicola forsteri</i>	<i>Carassius auratus</i>	10 e 20 mg/L	Eficácia de 100% após 24 h	Zhang et al (2014)
	<i>Cardicola forsteri</i>	<i>Thunnus maccoyii</i>	0,125 µg/mL	Efetivo após 48 h	Hardy-Smith et al (2012)
	<i>Diplozoon paradoxum</i>	<i>Squalius cephalus</i> e <i>Abramis brama</i>	20 e 50 µg/ml	Eficácia de 100% após 1 h	Schmahl & Taraschewski (1987)
Praziquantel	<i>Acolpenteron ureteroecetes</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	500 mg/L	Eficácia de 100% após 3 h	Reimschuessel et al (2011)
	<i>Dactylogyrus vastator</i>	<i>Carassius auratus</i>	14 mg/L	Eficácia de 100% após 24 h	Zhang et al. (2014)
	<i>Neoechinorhynchus rutili</i> e <i>Echinorhynchus truttae</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	500 µg/mL	Eficácia após 2 h	Taraschewski et al (1990)
	<i>Tagia ecuadori</i>	<i>Sphoeroides annulatus</i>	2,5 mg/L	Eficácia de 100%	Morales-Serna et al. (2018)
	<i>Neobenedenia melleni</i>	<i>Sphoeroides annulatus</i>	3,0 mg/L	Eficácia de 87%	Morales-Serna et al. (2018)

Diferentes classes de anti-helmínticos (benzimidazóis, avermectinas, levamisol, loperamida, niclosamida e praziquantel) têm sido utilizados no controle antiparasitário na medicina humana e veterinária (Horton 2003, McKellar & Jackson 2004, Shirakashi et al. 2012, Dar et al. 2017), bem como para peixes (Zuskova et al. 2018). Avermectinas como a ivermectina, são utilizadas no controle de helmintos, pois seu modo de ação é paralisar seletivamente o parasito, aumentando a permeabilidade muscular (Martin 1997, Collymore et al. 2014). O benzoato de emamectina, outra avermectina, é um inseticida frequentemente usado no controle de nematoides e artrópodes parasitos da lavoura (Stone et al. 1999; Ramstad et al. 2002; Bravo et al. 2008) e tem sido pouco utilizado no controle de parasitos de peixes. Em *Oncorhynchus tshawytscha*, 0.2 mg de ivermectina/kg não foi eficaz na eliminação de copépodes *Salmicola californiensis* (Johnson & Heindel, 2001). Porém, para *Danio rerio*, 0.45 mg de ivermectina/kg de dieta teve baixa eficácia (24%) contra nematoides *Pseudocapillaria tormentosa*, enquanto 0.25 mg de benzoato de emamectina/kg de dieta teve elevada eficácia, 90% (Collymore et al. 2014). Em *Dicentrarchus labrax*, 100 µg de benzoato de emamectina/kg na ração mostrou eficácia de 74% contra o copépode *Lernanthropus kroyeri*, após 21 dias de tratamento (Tokşen et al. 2010). Porém, esses quimioterápicos não têm sido usados no controle de acantocéfalos de peixes.

Entre outros anti-helmínticos, estão os benzimidazóis como albendazol, febendazol e mebendazol, que possuem mecanismo de interrupção na formação de microtúbulos, prejudicando a estrutura das células e secundariamente dificultando o transporte de glicose nos parasitos (Martin, 1997). Febendazol e mebendazol são compostos anti-helmínticos de amplo espectro, assim são muito utilizados para o tratamento contra tênias e parasitos gastrointestinais do homem e animais (Dar et al. 2017). Khalil et al. (2016) demonstraram que *Capillaria* sp. de *Bagrus docmac* exposto a 5,5 mg/L de albendazol apresentaram lesões na cutícula causadas pelo fármaco. A eficácia do albendazol tem sido testada no controle de alguns helmintos parasitos de peixes. Em *Piaractus mesopotamicus*, 50 e 500 mg/L de albendazol mostrou eficácia de 56,9% no controle de monogeneas *Anacanthorus penilabiatus*. Após banhos terapêuticos de *C. macropomum* com 500 mg/L de albendazol, houve baixa eficácia (48,6%) contra monogeneas *Anacanthorus spathulatus*, *Notozotecium janauachensis* e *Mymarothocium boegeri* e 6,6% de mortalidade dos peixes expostos (Alves et al. 2019). Em *Anguilla anguilla*, com 100 mg de albendazol teve eficácia de 100% contra monogeneas *Pseudodactylogyrus* spp. (Buchmann & Bjerregaard 1990). Por outro lado, banhos de 10, 100 e 500 mg/L de albendazol, para controle de *Ancylo-discoides vistulensis* em *Silurus glanis*, não mostraram qualquer eficácia (Szekely & Molnar 1990).

Outro benzimidazol comumente utilizado contra parasitos de peixes tem sido o febendazol, que atua interferindo no metabolismo gerador de energia em nematoides, levando-os a morte (Booth & McDonald 1992). Sopinska e Guz (1997) relataram que 40 mg de febendazol/kg de dieta para *Cyprinus carpio* reduziu a abundância cestoides *Bothriocephalus acheilognathi*. Similarmente, 75 mg de febendazol/kg na dieta de *Bidyanus bidyanus* reduziu 95% dos monogeneas em *Lepidotrema bidyana* (Forwood et al. 2013). Taraschewski et al. (1988) mostraram que 3 g de febendazol/kg na dieta de *Anguilla anguilla* teve 100% de eficácia contra o nematoide *Anguillicola crassus*, após 14 dias, apesar da baixa palatabilidade desse fármaco. Porém, 20 mg de febendazol/kg na dieta de *P. mesopotamicus* não mostrou eficácia contra nematoides *Rondonia rondoni* (Parra et al. 1997).

Kim et al. (1998) relataram 100% de eficácia de 0,2 g de mebendazol/kg de ração contra monogeneas *Microcotyle sebastis* em *Sebastes schlegeli*. Em banhos terapêuticos com 2 µg/mL de mebendazol contra o mixosporídeos *Glugea anomala* de *Gasterosteus aculeatus* foi também relatada boa eficácia (Schmahl e Benini 1998). Banhos terapêuticos com 100 mg/L de mebendazol resultaram em eficácia de 79,6% contra *A. penilabiatus* de *P. mesopotamicus* (Martins et al. 2001). Banhos terapêuticos com 10 mg/L de mebendazol tiveram 60% de eficácia contra *A. vistulensis* em *S. glanis* após 4 horas (Szekely e Molnar 1990). Banhos terapêuticos de 48 horas com 0.03 mg/L de mebendazol mostram baixa eficácia (46,9%) contra o monogeneas *Dactylogyrus vastator* de *Carassius auratus* (Zhang et al 2014). Estudos em *C. macropomum* usando 1.0 g de mebendazol/kg de dieta, para controlar *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri*, não tiveram eficácia após 14 dias de tratamento (Chagas et al. 2016). Similarmente, 10 g de mebendazol/kg de dieta em *Anguilla anguilla* não teve eficácia contra *Anguillicola crassus* (Taraschewski et al. 1988). Reimschuessel et al. (2011) também não obtiveram resultados *in vitro* satisfatórios usando 100 mg/L de mebendazol contra *Acolpenteron ureteroecetes* de *Micropterus salmoides*, pois os parasitos retornavam à atividade dentro da primeira hora.

Levamisol, um derivado do tetramisol do grupo dos imidotiazóis, causa paralisia neuromuscular em nematoides devido a estimulação dos gânglios parassimpáticos e simpáticos (Fujimoto et al. 2006); assim, tem sido também usado no controle anti-helmíntico em peixes. Esse fármaco também é conhecido como um imunoestimulante em mamíferos e peixes, influenciando os linfócitos T periféricos (Robertson e Martin 1993; Ispir e Dörücü 2005). Em *Pterophyllum scalare*, 1 g de levamisol associado a 2 g de praziquantel/kg de ração reduziu em 53% a infecção por nematoides *Capillaria* sp. (Fujimoto et al. 2006). Banhos de 24 horas com 1 mg/L de levamisol, contra nematoides *Anguillicola crassus* em *Anguilla anguilla*, mostraram

100% de eficácia (Taraschewski et al. 1988). Porém, 362 e 640 mg de levamisol adicionado a ração de *P. mesopotamicus* foram ineficazes contra *A. penilabiatus* (Schalch et al. 2009). Em *Oncorhynchus mykiss*, 40 g de levamisol/kg de dieta também não foi eficaz contra monogêneas *Gyrodactylus* sp. (Tojo e Santamarina 1998). Em *C. macropomum*, banhos com 125 mg/L de levamisole não causou mortalidade nos peixes e teve eficácia de 88,2% contra *Anacanthorus spatulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni* (Alves et al. 2019).

Praziquantel tem sido comumente usado na medicina veterinária e humana contra parasitos cestoides e trematoides (Yamamoto et al. 2011, Shirakashi et al. 2012, Zuskova et al. 2018). Esse anti-helmíntico é extremamente amargo e por isso, possui pouca palatabilidade para os peixes, o que dificulta a sua administração na dieta. Tem o mecanismo de ação baseado na despolarização do tegumento dos helmintos, levando a entrada de cálcio na célula. Assim, atua alterando a homeostasia do cálcio nas células dos helmintos e provocando a contração da musculatura, que resulta em paralisia e morte dos parasitos; devido ao prejuízo do sistema neuromuscular, inibição na fixação do parasito no hospedeiro e alteração na permeabilidade do seu tegumento, levando-o a desequilíbrios osmótico e nutricionais, além de apresentar toxicidade para os hospedeiros (Sitja-Bobadilla et al. 2006, Yamamoto et al. 2006, Williams et al. 2007, Zuskova et al. 2018).

Foi relatada redução de 80,0% nos níveis de monogêneas *Neobenedenia girellae* com a adição de 150 mg de praziquantel/kg na dieta em *Scomber japonicus* (Yamamoto et al. 2011). Similarmente, em *Barbus barbus* após quatro dias de banhos com 10 e 20 mg/kg de praziquantel, houve 100% de eficácia contra metacercárias de *Diplostomum spathaceum* nos olhos. A administração oral de 50 mg/kg de praziquantel reduziu em 80,0% as infecções por acantocéfalos *Pomphorhynchus laevis* no intestino de *Barbus barbus* (Zuskova et al. 2018). Forwood et al. (2013) relataram que 10 mg/kg de praziquantel na ração de *Bidyanus bidyanus* teve 99,0% de eficácia contra monogênea *Lepidotrema bidyana*. Em banhos com 10 mg/L de praziquantel, houve 100% de eficácia contra monogêneas *A. vistulensis* em *S. glanis*, após 5 horas (Szekely e Molnar 1990). Zhang et al. (2014) também mostraram eficácia de 80,0% em banhos com 20 mg/L de praziquantel contra monogêneas *Dactylogyrus vastator* em *Carassius auratus*, após 48 h. Shirakashi et al (2012) demonstraram que a administração oral de 15 mg/kg/dia de praziquantel em *Thunnus orientalis*, durante 3 dias consecutivos, erradicou *Cardicola opisthorchis* e *Cardicola orientalis*. Porém, Onaka et al. (2003) encontraram baixa eficácia de 50, 100, 200 e 500 mg/L de praziquantel na dieta de *P. mesopotamicus* contra *A. penilabiatus*.

Loperamida, um antidiarreico sintético que influencia na P-glicoproteína, tem sido pouco testado no controle de parasitos de peixes. Observações em microscopia eletrônica, mostrou que a loperamida leva a contrações e necrose em acantocéfalos *Neoechinorhynchus rutili* e *Echinorhynchus truttae*, bem como ao inchaço mitocondrial e abundância de bolhas na superfície, que pode resultar na expulsão do citoplasma para fora dos poros tegumentais (Taraschewski et al 1990). Em porcos infectados por acantocéfalos *Macracanthorhynchus hirudinaceus*, 1,5 mg de loperamida/kg de dieta mostrou 100% eficácia, após uso de 3 dias (Mehlhorn et al. 1990). Taraschewski et al. (1990), também encontrou eficácia *in vitro* desse fármaco em acantocéfalos *N. rutili* e *E. truttae* de *Oncorhynchus mykiss* (Tabela 1).

Devido à falta de informações sobre os efeitos do albendazol, benzoato de emamectina, febendazol, ivermectina, levamisol, loperamida, mebendazol e praziquantel em acantocéfalos *N. buttnerae*, este estudo visou pesquisar qual(is) melhor(es) quimioterápico(s) contra esses parasitos de *C. macropomum*.

1.4. Toxicidade da ivermectina e levamisol em peixes

A toxicidade de uma determinada substância química é a propriedade de potencialmente estabelecer um estado patológico quando introduzida em um organismo ou interagindo com ela. Em relação aos peixes, isso pode ser verificado através de avaliação toxicológica, obtendo-se dados como concentração, sinais clínicos e efeitos adversos ocorridos (Tavares-Dias, 2018). Assim, quando um anti-helmíntico demonstra eficácia *in vitro* para qualquer parasito, é fundamental determinar as concentrações do fármaco que são seguras para a espécie de peixe, pois os estudos de toxicidade auxiliam na segurança do tratamento (Johnson et al 1993; Siroka e Svobodova 2013, Pahor-Filho et al. 2017).

Os bioensaios de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. A toxicidade aguda é o efeito deletério (letalidade ou alguma outra manifestação que a anteceda) causado por amostra simples ou composta, a organismos-testes em um curto período de exposição (por exemplo 24 a 96h), em relação ao seu ciclo de vida. Já a toxicidade crônica é o efeito deletério causado por amostra simples ou composta, sendo que o teste crônico, normalmente apresenta a duração de uma semana ou mais de exposição dos organismos, em relação ao seu ciclo de vida (Magalhães e Ferrão-Filho 2008).

Levamisol é um anti-helmíntico que pode ocasionar efeitos neurotóxicos em muitos animais (Pancarci et al 2007; Rehni e Singh 2010; Siroka e Svobodova 2013). Altas concentrações de levamisol (500 e 1000 mg/kg) na dieta de *Morone chrysops* e *Morone saxatilis* levaram a toxicidade, redução no crescimento e no consumo alimentar (Li et al. 2004). Li et al.

(2006) relataram que após 3 semanas de alimentação em *M. chrysops* e *M. saxatilis* com 100, 250, 500 e 1000 mg/kg de levamisol, ocorreu ganho de peso nos peixes suplementado com dietas com níveis mais baixos (<500 mg/kg) de levamisol, além disso, a suplementação com 100 mg/kg de levamisol aumentou o crescimento e eficiência alimentar. Os peixes alimentados com dieta suplementada com 1000 mg/kg de levamisol apresentaram sinais de toxicidade crônica e crescimento inferior, redução do consumo de ração e da eficiência alimentar. O hematócrito, lisozima sérica e peroxidase não foram afetados pelos tratamentos com levamisol. Porém, após 10 semanas de tratamento com 500 mg/kg de levamisol na dieta de *Sparus aurata*, foi observado melhor crescimento e ganho de peso dos animais (Mulero et al. 1998).

O uso prolongado de levamisol (50, 100, 200, 400 e 800 mg/kg) na dieta de *P. mesopotamicus* não causou alterações no crescimento dos peixes, mas após 15 dias houve redução do número de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e células granulocíticas especiais, devido a toxicidade nos tecidos linfopoiéticos (Sado et al. 2010). Porém, Em *P. mesopotamicus*, o uso de 125, 250 e 500 mg/kg de levamisol, durante 15 dias, aumentou os níveis de anticorpos, hematócrito, número eritrócitos, leucócitos e trombócitos totais (Biller-Takahashi et al 2016).

Alimentação de *Cirrhinus mrigala* com 250 mg/kg de levamisol aumentou o crescimento, atividade enzimática, número de eritrócitos e leucócitos totais, bem como a atividade fagocitária, melhorando a resistência contra *Aeromonas hydrophila* (Bhatnagar e Lamba 2016). Em *S. aurata*, dietas com 125, 250 e 500 mg/kg de levamisol, após cinco semanas reduziu o hematócrito e aumentou os leucócitos e a resistência contra *Vibrio anguillarum* (Mulero et al 1998). Em *Cyprinus carpio* alimentadas com de 250 mg/kg de levamisol (Maqsood et al. 2009) e *Oreochromis niloticus* com 1250 mg/kg de levamisol (Bedasso 2017) houve aumento do crescimento e da imunidade inespecífica, aumentando assim a resistência dos peixes à infecção por *A. hydrophila*. Em *Labeotrophus fuelleborni*, dieta contendo 2 mg/kg de levamisol aumentou o ganho de peso, número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, mas reduziu a taxa de conversão alimentar dos peixes (Amiri e Bahrekazemi, 2017).

Em *P. mesopotamicus* alimentados com dietas contendo 500 mg/kg de levamisol ocorreu maior esforço do fígado na metabolização do fármaco com o aumento de dilatação sinusoidal, congestão e infiltração leucocitária, além de mortalidade de 20% dos peixes. Porém, 300 mg/kg de levamisol na dieta não causou nenhum sinal de hepatotoxicidade (Pahor-Filho et al. 2017). Em *Pseudoplatystoma reticulatum*, 500 mg/kg de levamisol na dieta não causou sinais de toxicidade, apesar do reduzido desempenho dos peixes tratados com 100 mg/kg

(Zanon et al. 2014). Porém, não há estudos sobre a toxicidade do levamisol na dieta de *C. macropomum*.

Ivermectina é um fármaco contraindicado para animais domésticos, pois causa toxicidade levando a letargia, anorexia e mortalidade (Plumb 2008; Kenny et al. 2008; Hsu 2008; Merola et al. 2009). Em *Dicentrarchus labrax*, a DL_{50} estimada foi de 0,52 mg/kg para administração oral e 0,36 mg/kg para injeção intraperitoneal de ivermectina. Porém, a toxicidade (> 10%) foi observada quando 0,2 e 0,5 mg/kg de ivermectina foi administrado via intubação oral e injeção. Além disso, a ivermectina foi mais tóxica para peixes de 3 g que para peixes 35 g quando administrada por injeção. Análises histopatológicas dos principais órgãos revelou que a patologia foi amplamente restrita as brânquias e tecido intestinal, mas peixes de 3 g apresentaram também lesões nos rins (Athanassopoulou et al. 2002). Em *Salmo salar*, foi relatado mortalidade de 5% dos peixes suplementados com 0,05 mg/kg e 70% de mortalidade nos peixes que receberam na dieta 0,25 mg/kg de ivermectina para tratamento contra *L. salmonis* e *Caligus* sp. (Ucán-Marín et al. 2012). Similarmente, houve mortalidade de 100% de *S. aurata* após 96 horas de banho com 1,8 mg/L de ivermectina (Mladineo et al. 2006).

Exames histopatológicos não mostraram qualquer sinal de toxicidade de 0,05; 0,10 e 0,20 mg/kg de ivermectina em *Oncorhynchus kisutch*, *O. mykiss* e *Oncorhynchus tshawytscha* (Johnson et al. 1993). Porém, 7 µg/L de ivermectin causou alterações neurotóxicas, necrose e hepatite após 24 e 96 h de exposição em *D. rerio* e *Catla catla* (Thiripurasundari et al. 2014). Para *D. rerio*, 0,05 mg/kg de ivermectina na dieta causou ligeiras alterações comportamentais e diminuição da fecundidade, enquanto 0,10 mg/kg resultou em alterações comportamentais graves e 24% de mortalidade dos peixes (Collymore et al. 2014). Em *S. aurata*, administração oral de 0,2 mg/kg de ivermectina não causou alterações estruturais no fígado dos peixes, mas levou a alterações em um conjunto de 36 proteínas hepáticas que indicaram hepatotoxicidade (Varó et al. 2010).

Parâmetros hematológicos usados para investigar a toxicidade de 100, 200, 400 e 800 µg/kg de ivermectina em *S. aurata*, mostraram uma redução no hematócrito e aumento da concentração de hemoglobina e glicose plasmática, número de leucócitos totais, linfócitos e monócitos nas maiores concentrações, na primeira hora. Além disso, ocorreu perda de apetite, letargia e escurecimento da pele dos peixes tratados com as concentrações de 400 e 800 µg/kg de ivermectina. Porém, não houve mortalidade de peixes e esses parâmetros sanguíneos retornaram aos valores basais após 30 dias de recuperação, sugerindo reversibilidade do anti-helmíntico (Katharios et al. 2002). Todavia, não há estudos sobre a toxicidade da ivermectina em *C. macropomum*, impossibilitando o uso deste fármaco na piscicultura deste peixe.

2. Problemas

Entre os quimioterápicos albendazol, benzoato de emamectina, febendazol, ivermectina, levamisol, loperamida, mebendazol e praziquantel), qual (is) possui (em) melhor eficácia *in vitro* contra *N. buttnerae* de *C. macropomum*?

Quais os efeitos tóxicos de elevadas concentrações de levamisol e ivermectina na sobrevivência e hematologia de *C. macropomum*?

3. Hipóteses

- Loperamida apresenta maior eficácia contra *N. buttnerae*, pois estudos anteriores mostraram uma alta eficácia contra outros acantocéfalos em peixes. Secundariamente, os quimioterápicos albendazol, febendazol e mebendazol também apresentam eficácia *in vitro* contra *N. buttnerae*, pois são benzimidazóis com reconhecida eficácia contra outras espécies de helmintos de peixe.
- Elevadas concentrações de levamisol e ivermectina causam mortalidade e alterações sanguíneas em *C. macropomum* devido a toxicidade.

4. Objetivos

4.1. Geral

Avaliar a eficácia antiparasitária *in vitro* do albendazol, levamisol, mebendazol, benzoato de emamectina, febendazol, ivermectina, loperamida e praziquantel contra *N. buttnerae* de *C. macropomum*, bem como a toxicidade do levamisol e ivermectina na dieta desse peixe.

4.2. Específicos

- Determinar as concentrações de albendazol, levamisol, mebendazol, benzoato de emamectina, febendazol, ivermectina, loperamida e praziquantel com eficácia *in vitro* contra *N. buttnerae* de *C. macropomum*;
- Avaliar os efeitos tóxicos de elevadas concentrações de levamisol e ivermectina na dieta de *C. macropomum*.
- Indicar o(s) melhor(es) anti-helmíntico (s) com ação antiparasitária no controle de *N. buttnerae* de *C. macropomum*;

5. Referências

- Aguiar, L. S., Oliveira, M. I. B., Matos, L. V., Gomes, A. L. S., Costa, J. I., and Silva, G. S. 2018. Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Parasitology Research. **117**:1689–1698.
- Alves, C. M. G, Nogueira, J. N., Barriga, I. B., Santos, J. R., Santos, G. G., and Tavares-Dias, M. 2019. Albendazole, levamisole and ivermectin are effective against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae). Journal of Fish Diseases. **42**:405–412.
- Amiri, Z., and Bahrekazemi, M. 2017. Effect of oral administration of levamisole, quil-a and cinnamon in growth amount, hematological and immune parameters of Marmalade cichlid, *Labeotropheus fuelleborni* (Ahl, 1926). Iranian Journal of Aquatic Animal Health **3**:86-97.
- Araújo-Lima, C. A., and Goulding, M. 1998. Os frutos o tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá. Brasília-CNPQ, Tefé, Amazonas.
- Athanassopoulou, F., Ragias, V., Roth, M., Liberis, N., and Hatzinikolaou, S. 2002. Toxicity and pathological effects of orally and intraperitoneally administered ivermectin on sea bass *Dicentrarchus labrax*. Disease of Aquatic Organisms **52**:69-76.
- Bedasso, G. T. 2017. A Study of immune response in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed levamisole incorporated diet. Journal of Immunology and Infectious Diseases **4**:1-5.
- Biller-Takahashi, J. D., Montassierb, H. J., Takahashia, L. S., and 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.
- Bhatnagar, A., and Lamba, R. 2016. Immunostimulating and growth promoting activity of dietary levamisole on *Cirrhinus mrigala* Fingerlings. Journal of Aquaculture and Marine Biology **4**: 00102.
- Booth, N., and Mcdonald, L. E. 1992. Farmacologia e terapêutica em veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Bravo, S., Sevatdal, S., and Horsberg, T. E. 2008. Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate in Chile. Aquaculture **282**:7-12.
- Buchmann, K. and Bjerregaard, J. 1990. Comparative efficacies of commercially available benzimidazoles against *Pseudodactylogyus* infestations in eels. Diseases of Aquatic Organisms **9**:117-120.
- Campos-Baca, L., and Köhler, C. C. 2013. Aquaculture of *Colossoma macropomum* and related species in Latin America. American Fisheries Society Symposium Series **46**:541-561.

- Chagas, E. C., L. D. de Araújo, M. L. Martins, L. de Carvalho Gomes, J. C. de Oliveira Malta, A. B. Varella, and G. T. Jerônimo. 2016. Mebendazole dietary supplementation controls Monogenoidea (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* **464**:185–189.
- Collymore, C., V. Watral, J. R. White, M. E. Colvin, S. Rasmussen, R. J. Tolwani, and M. L. Kent. 2014. Tolerance and efficacy of emamectin benzoate and ivermectin for the treatment of *Pseudocapillaria tomentosa* in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* **11**:490–497.
- Dar, S. A., Gora, A.H., Bhat, I.A., Kumar, S., Srivastava, P.P, Muralidhar, P.A., and Subodh Gupta, S. 2017. Studies of anthelmintic benzimidazole derivatives on cytochrome P450 1A (CYP1A) dependent detoxification mechanism in *Labeo rohita*. *Aquaculture* **48**:79–84.
- Dias, M. K. R., Neves, L. R., Marinho, R. G. B., Pinheiro, D. A., and Tavares-Dias, M. 2015. Parasitismo em tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*, Characidae) cultivados na Amazônia, Brasil. *Acta Amazonica* **45**:231-238.
- FAO. 2018. The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO.
- Forwood, J. M., Harris, J. O., and Deveney, M. R. 2013. Efficacy of bath and orally administered praziquantel and fenbendazole against *Lepidotrema bidyana* Murray, a monogenean parasite of silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Journal of Fish Diseases* **36**:939–947.
- Fujimoto, R. Y. L. Vendruscolo, S. H. C. Schalch, e F. R. Moraes. 2006. Avaliação de três diferentes métodos para o controle de monogenéticos e *Capillaria sp.* (Nematoda: Capillariidae), parasitos de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare* Liechtenstein, 1823). *Boletim do Instituto de Pesca* **32**:183–190.
- Golvan, Y. J. 1956. Acanthocephales d'amazonie. Redescription D'*Oligacanthorhynchus iheringi* Travassos, 1916 et description de *Neoechinorhynchus buttnerae* n. sp. (Neoacanthocephala- Neoechinorhynchidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparé* **31**:500–524.
- Goulding, M., and Carvalho, M. L. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia* **1**:107-133.
- Horton, J. 2003. Global anthelmintic chemotherapy programs: learning from history. *Trends in Parasitology* **19**:405-408.

- Hsu, W. H. 2008. Handbook of veterinary pharmacology. Wiley-Blackwell, 1^o Ed. Iowa, USA.
- IBGE (2016). Produção da pecuária municipal 2016. GEPEC/COAGRO, Rio de Janeiro.
- Ispir Ü. and Dörücü M. 2005. A Study on the Effects of Levamisole on the Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences **29**: 1169-1176.
- Jerônimo G. T., Pádua S. B., Belo M. A. A., Chagas E. C., Taboga S. R., Maciel P. O., Martins M. L. 2017. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. Aquaculture **469**:124–127.
- Johnson S. C., and Margolis L. 1993. Efficacy of ivermectin for control of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* on Atlantic salmon. Disease of Aquatic Organisms **17**:101–105.
- Johnson, K. A., and J. A. Heindel. 2001. Efficacy of manual removal and ivermectin gavage for control of *Salmincola californiensis* (Wilson) infestation of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), captive broodstocks. Journal of Fish Diseases **24**:197–203.
- Kennedy, C. R. 2006. Ecology of acanthocephala. Cambridge University Press. New York, New York, USA.
- Khalil, A. I., G. Y. Osman, O. A. M. Maghrabi, N. A. Radwan, and A. M. A. Msalam. 2016. In vitro Effect of LC 90 of albendazole and *Allium sativum* water extract on the fine structure of *Capillaria* sp . (Capillaridae : Nematoda). Journal of Bioscience and Applied Research **2**:125–135.
- Katharios, P., Iliopoulou-Georgudaki, J., Kapata-Zoumbos, K., and Spiropoulos, S. 2002. Toxicity of intraperitoneally injected ivermectin in sea bream, *Sparus aurata*. Fish Physiology Biochemistry **25**:99–108.
- Kenny, P. J., Vernau, K. M., Puschner, B., and Maggs, D. J. 2008. Retinopathy associated with ivermectin toxicosis in two dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association **233**:279 – 284.
- Kim, K. H., S. Park, and Jee, B. Y. 1998. Efficacy of oral administration of Praziquantel and Mebendazole against *Microcotyle sebastis* (Monogenea) Infestation of Cultured Rockfish (*Sebastes schlegeli*). Fish Pathology **33**:467–471.
- Li, P., Wang, X., and Gatlin, D. M. 2004. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid striped bass, *Morone chrysops* X *Morone saxatilis*, and elevated levamisole in vitro impairs macrophage function. Aquaculture Research **35**: 1380 – 1383.

- Li, P., Wang, X., and Gatlin, D. M. 2006. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* **251**: 201–209.
- Lourenço, F. S., Morey, G. A. M., Pereira J. N., Malta J. C. O. 2017. Ocorrência de *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *buttnerae* GOLVAN, 1956 (Acantocephala: Neoechinorhynchidae) em *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) (characiformes: serrasalmidae) provenientes de uma piscicultura da Amazônia brasileira. *Folia amazónica, Instituto de Investigaciones de la Amazonía peruana* **26**:1– 8.
- Lourenço, F. S., Morey, G. A. M., Pereira J. N., and Malta J. C. O. 2018. The development of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) in its intermediate host *Cypridopsis vidua* in Brazil. *Acta Parasitologica* **63**: 354 – 359.
- Magalhães, D. P., and Ferrão-Filho A. S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* **12**:355-381.
- Malta, J. C. O., Gomes, A. L. S., Andrade, S. M. S., Varella, A. M. B. 2001. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. *Acta Amazonica* **31**:133-143.
- Maqsood, S., Samoon, M. H., and Singh, P. 2009. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **9**:111-120
- Martins, M. L., Onaka, E. M., Moraes, F. R., and Fujimoto, R.Y. 2001. Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridade) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil: efficacy and hematology. *Acta Parasitology* **46**:332–336.
- Martin, R. J. 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal* **154**:11-34.
- Matos, L. V., de Oliveira M. I. B., Gomes A. L. S., and Silva G. S. 2017. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitology Research* **116**: 1029–1037.
- McKeller, Q. A. and Jackson, F. 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in Parasitology* **20**: 456-460.
- Mehlhorn, H., Taraschewski, H., Zhao, B., Raether, W., and Dunagan, T. T. 1990. Loperamid, an efficacious drug against the acanthocephalan *Macracanthorhynchus birudinaceus* in

- pigs. *Parasitology Research* **76**: 624–626.
- Merola, V., Khan S., Gwaltney-Brant, S. 2009. Ivermectin toxicosis in dogs: a retrospective study. *Journal of the American Animal Hospital Association* **45**:106 – 111.
- Mladineo, I., Marsic-Lucic, J., Buzancic, M., 2006. Toxicity and gross pathology of ivermectin bath treatment in sea bream *Sparus aurata* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **63**:438–442.
- Morales-Serna, F. N., Chapa-López, M., Martínez-Brown, J. M. Ibarra-Castro, L., Medina-Guerrero, R. M., and Fajer-Ávila, E. J. 2018. Efficacy of praziquantel and a combination anthelmintic (Adecto®) in bath treatments against *Tagia ecuadori* and *Neobenedenia melleni* (Monogenea), parasites of bullseye puffer fish. *Aquaculture* **492**:361–368.
- Mulero, V., Esteban, M. A., Muñoz, J., and Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* **8**:49–62.
- Nickol, B. B. 2006. Phylum Acanthocephala. Pages: 444-465 in P. T. K. Woo, editor. *Fish diseases and disorders, second edition: protozoan and metazoan infections*. Wallingford, Oxfordshire, England.
- Onaka, E. M., Martins M. L., and Moraes F. R. 2003. Eficácia do albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (monogenea : dactylogyridae), parasito de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes :Characidae). I. banhos terapêuticos. *Boletim do Instituto de Pesca* **29**:101–107.
- Pahor-Filho, E., Júnior, J. P., Pilarski, F., and Urbinati, E. C. 2017. Levamisole reduces parasitic infection in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* **470**:123–128.
- Pancarci, S. M., Gungor, O., Gurbulak, K., Cenesiz, M., Kaya, M., Cenesiz, S., and Guzeloglu, A. 2007. Effects of levamisole on pregnancy in ewes. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **51**:253-256.
- Parra, J. E. G., Brandão D. A., and Ceccarelli P. S. 1997. Eficácia do febendazole no controle de nematódeos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1987). *Ciência Rural, Santa Maria* **27**:297-299.
- Plumb, D. C. 2008. *Veterinary Drug Handbook*, 6^a edição. Iowa State University Press, Ames, EUA.
- Ramstad, A., Colquhoun, D. J., Nordmo, R., Sutherland, I. H., and Simmons, R. 2002. Field trials in Norway with SLICE® (0.2% emamectin benzoate) for the oral treatment of sea lice infestation in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* **50**:29-33.

- Reimschuessel, R., Giesecker C., and Poynton, S. 2011. *In vitro* effect of seven antiparasitics on *Acolpenteron ureteroecetes* (Dactylogyridae) from largemouth bass *Micropterus salmoides* (Centrarchidae). *Diseases of Aquatic Organisms* **94**:59–72.
- Rehni A. K. and Singh T. G. 2010. Levamisole-induced reduction in seizure threshold: a possible role of nicotinic acetylcholine receptor-mediated pathway. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **382**:279–285.
- Robertson S. J. and Martin R. J. 1993. Levamisole activated single-channel currents from muscle of the nematode parasites *Ascaris suum*. *British Journal of Pharmacology* **108**: 170–178.
- Sado, R. Y., Bicudo, A. J. A., and Cyrino, J. E. P. 2010. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). *Journal of the World Aquaculture Society* **41**:66-75.
- Saint-Paul, U. 1991. The potential for *Colossoma* culture in Latin America. *Infofish International* **2**:49-53.
- Saint-Paul, U. 2017. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources* **5**:1–9.
- Schalch, S. H. C., Moraes, F. R., and Soares, V. E. 2009. Praziquantel, levamisol e difubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* **18**:53–59.
- Schmahl, G., and J. Benini. 1998. Treatment of fish parasites. II. Effects of different benzimidazole derivatives (albendazole, mebendazole, fenbendazole) on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia): ultrastructural aspects and efficacy studies. *Parasitology research* **84**:41–49.
- Shirakashi, S., Andrews, M., Kishimoto, Y., Ishimaru, K., Okada, T., Sawada, Y., and Ogawa, K. 2012. Oral treatment of praziquantel as an effective control measure against blood fluke infection in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture* **326-329**:5–19
- Silva, R. M., Tavares-Dias, M., Dias, M.W.R., and Marinho, R.G.B. 2013. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **48**:1049-1057.
- Silva-Gomes A. L., Coelho-Filho J. G., Viana-Silva W., Braga-Oliveira M. I., and Bernardino G., Costa J. I. 2017. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neochinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), reared in ponds. *Latin American Journal of Aquatic Research* **45**:496-500.

- Siroka, Z. and Svobodova, Z. 2013. The toxicity and adverse effects of selected drugs in animals – overview. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **16**: 181–191.
- Sitja-Bobadilla, A., Felipe, M. C., and Alvarez-Pellitero, P. 2006. *In vivo* and *in vitro* treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* **261**:856–864.
- Sopinska, A. and Guz, L. 1997. Fenbendazole treatment against *Bothriocephalus acheilognathi* in *Cyprinus Carpio*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **17**:3-4.
- Stone, J., Sutherland, I. H., Somerville, C. S., Richards, R. H., and Varma, K. J. 1999. The efficacy of emamectin benzoate as an oral treatment of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) infestations in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **22**:261–270.
- Szekely, C. & Molnar, K. 1990. Treatment of *Ancylodiscoides vistulensis* monogenean infestation of the European catfish *Silurus glanis*. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists* **10**:74-77.
- Taraschewski, H. and Raether, W. 1990. Loperamid, an efficacious drug against fish-pathogenic acanthocephalans. *Parasitology research* **76**:619–623.
- Taraschewski, H., Renner, C., and Mehlhorn, H. 1988. Effects of levamisole HCl, metrifonate, fenbendazole, mebendazole, and ivermectin on *Anguillicola crassus* (nematodes) pathogenic in the air bladder of eels. *Parasitology research* **74**:281-289.
- Tavares-Dias, M. 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquatic Living Resources* **31**: 1-11.
- Tavares-Dias, M. and Martins, M. L. 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases* **41**:913-918.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F. R., Martins, M. L., and Kronka, S. N. 2001. Fauna parasitária de peixes oriundos de pesque-pagues do município de Franca, São Paulo Brasil. II. Metazoários. *Revista Brasileira de Zoologia* **18**:81–95.
- Thatcher, V. E. 2006. *Amazon fish parasites*, 2 ed. Pensoft Publisher Sofia, Moscow.
- Thiripurasundari, M., Sathya, K., Uma, A., Srinivasan, M. R., and Rajasekar, P. 2014. A comparative study on the toxicity of ivermectin in zebra fish and catla fish models. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* **4**:3683-3688.
- Tojo, J. L. and Santamarina, M.T. 1998. Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. II: *Gyrodactylus* sp. *Disease of Aquatic Organisms* **33**:187-193.
- Tokşen, E., Değirmenci U., and Cankurt, M. 2010. The effect of trichlorfon on the control of

- Lernanthropus kroyeri* (van Beneden, 1851) (Lernanthropidae) infestations in Cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists **30**:205–210.
- Ucán-Marín, F., Ernst, W., O'Dor, R. K., and Sherry, J. 2012. Effects of food borne ivermectin on juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Survival, growth, behavior, and physiology. Aquaculture **334-337**:169–175
- Valladão, G., Gallani, S.U., and Pilarski, F. 2018. South American fish for continental aquaculture. Reviews in Aquaculture **10**:351-369.
- Van der Meer, M. B. 1997. Foods and feeding strategies for *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818). Fish growth as related to dietary protein. Tese Doutorado. Wageningen Agricultural University. Ponsen & Louijen, Wageningen.
- Varó, I., Rigos, G., Navarro, J. C., Ramo, J., Caldach-Giner, J., Hernández, A. J., and Pertusa, A. 2010. Torreblanca effect of ivermectin on the liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*: A proteomic approach. Chemosphere **80**:570–577.
- Williams, R. E., Ernst, I., Chambers, C. B., and Whittington, I. D. 2007. Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriolae* and *Benedenia seriolae* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. Diseases of Aquatic Organisms **77**:199–205.
- Yamamoto, S., Yoneshima, H., Takai, K., Izumi, K., Kato, K., Miyashita, S., and Murata, O. 2006. Parasitism of *Neobenedenia girellae* of cultured Pacific mackerel, *Scomber japonicus*. Bulletin of the Fisheries Laboratory of Kinki University **10**:27–34.
- Yamamoto, S., Shirakashi S., Morimoto S., Ishimaru K., and Murata, O. 2011. Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. Aquaculture **319**:53–57.
- Zanon, R. B., Cerozi, B. S., and Cyrino, J. E. P. 2014. Dietary levamisole as immunostimulant for striped Surubim, *Pseudoplatystoma reticulatum*. Journal of the World Aquaculture Society **45**:672-680.
- Zhang, X. P., Li, W. X., Ai, T. S., Zou H., Wu, S. G., and Wang, G. T. 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). Aquaculture **420-421**:302–307.
- Zuskova, E., Piackova, V., Machova, J., Chupani, L., Steinbach, C., Stara, A., and Velisek, J. 2018. Efficacy and toxicity of praziquantel in helminth-infected barbel (*Barbus barbus* L.). Journal of Fish Diseases **41**:643–649.

ARTIGO 1

Avermectins, praziquantel and levamisole have *in vitro* efficacy against *Neoechinorhynchus buttnerae* (Neoechinorhynchidae) in *Colossoma macropomum*, a Serrasalminidae from the Amazon

Publicado no periódico Journal of Fish Diseases

Avermectins, praziquantel and levamisole have *in vitro* efficacy against *Neoechinorhynchus buttnerae* (Neoechinorhynchidae) in *Colossoma macropomum*, a Serrasalminidae from the Amazon

Running head: *In vitro* efficacy of anthelmintic drugs

Lígia Carvalho Dias Oliveira¹, Cláudia Majolo², Franmir Rodrigues Brandão³, Caio Francisco Santana Farias⁴, Maria Inês Braga Oliveira³, Welliton Bezerra Santos⁵, Patrícia Castro Monteiro³, Maria Juliete Souza Rocha³, Edsandra Campos Chagas^{2,3}, Marcos Tavares-Dias^{1,6*}

¹Postgraduate Program on Tropical Biodiversity (PPGBio), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brazil.

²Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brazil.

³Postgraduate Program on Fishery Sciences in the Tropics, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil.

⁴Uninorte Laureate International Universities, Av. Leonardo Malcher 715, Manaus, AM, Brazil.

⁵Universidade Nilton Lins, Avenida Professor Nilton Lins 3259, Manaus, AM, Brazil.

⁶Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brazil.

*Author for correspondence: Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, Macapá, AP, Brazil. Email: marcos.tavares@embrapa.br

Neoechinorhynchus buttnerae Golvan 1956 is an acanthocephalan of the family Neoechinorhynchidae for which the ostracod *Cypridopsis vidua* (Müller, 1776) Brady, 1867 is the intermediate host (Lourenço et al., 2018). This endoparasite cause great problems in aquaculture production of *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Brazilian Amazon, where it infects 100% (Lourenço et al., 2017; Jerônimo et al., 2017; Matos et al., 2017), affecting the intestinal tissue of hosts and causing impairments of nutrient uptake (Matos et al., 2017) and leading to great economic losses (Silva-Gomes et al., 2017). However, this helminth endoparasite has been often neglected as causative agents of *C. macropomum* diseases. Therefore, as this acanthocephalan may have detrimental consequences for health of this farmed fish it is important to implement strategies to control them.

Anthelmintic drugs such as avermectins (ivermectin and emamectin benzoate) and benzimidazoles (albendazole, mebendazole and fenbendazole) have been used to treat parasitic infections by monogeneans, nematodes, digeneans and cestodes in different fish species (Hardy-Smith et al., 2012; Shinn & Bron, 2012; Collymore et al., 2014). Despite continuing need to expand the use of strategies for integrated management of parasite control among farmed fish (Shinn & Bron, 2012), treatment with anthelmintic drugs is a tool that has been little tested for controlling infections by acanthocephalan species. Levamisole, loperamide and praziquantel have been recommended for *in vitro* control of the acanthocephalans *Neoechinorhynchus rutili* and *Echinorhynchus truttae* in *Oncorhynchus mykiss* (Taraschewski et al., 1990). Praziquantel has also shown potential as an oral treatment against the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* in *Barbus barbus* (Zuskova et al., 2018). The number of antiparasitic drugs that are efficacious, consistent and safe and which can be used across a wide range of environmental conditions is very limited. Since no other suitable chemotherapeutic treatments for acanthocephalan infections in fish are available, the aim of this study was to investigate the efficacy, *in vitro*, of albendazole, levamisole, fenbendazole, mebendazole, praziquantel, ivermectin, loperamide and emamectin benzoate against *N. buttnerae* in *C. macropomum*.

For these trials *in vitro*, we use eight anthelmintic drugs and forty juveniles of *C. macropomum* (100.0 ± 20.0 g) obtained from a commercial fish farm in Manaus, Amazonas state (Brazil). All the fish had the intestine naturally infected by *N. buttnerae*. Parasites obtained were stored in Eagle's minimal essential at room temperature (25.0 ± 1.0 °C) in combination with different concentrations of albendazole, levamisole, mebendazole, fenbendazole, emamectin benzoate, ivermectin, loperamide and praziquantel. The efficacy of concentrations of each anthelmintic drug was tested using three replicates per treatment and

10 adults of *N. buttnerae* in each replicate. The endoparasites were considered dead when had totally lost mobility. The effective concentration (EC_{50-24h}) and 95% confidence interval were determined for each anthelmintic drug, using the trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton et al., 1977).

Only the concentrations of levamisole, praziquantel, emamectin benzoate and ivermectin caused mortality of *N. buttnerae*. The EC_{50} was also determined for the anthelmintic drugs (Table 1). For levamisole, the 95% confidence interval was 49.3-108.8 mg/L; for praziquantel, 1800-2000 mg/L; for emamectin benzoate, 52.7-72.4 mg/L; and for ivermectin 2700-3100 mg/L. However, the effects of emamectin benzoate and levamisole were not dependent on concentration. Praziquantel also presented high efficacy *in vitro* against *N. rutili* and *E. truttae* in *O. mykiss* (Taraschewski et al., 1990). Low concentrations of ivermectin in the diet of *Danio rerio* had little efficacy (24%) against the nematodes *Pseudocapillaria tomentosa*, while emamectin benzoate had 90% efficacy (Collymore et al., 2014). Despite this positive effect of emamectin benzoate, its use is restricted for agriculture in the most of states in Brazil, thus limiting its use in aquaculture, which has not legal approbation.

Table 1. Efficacy of different concentrations of the anthelmintics in *Neoechinorhynchus buttnerae* de *Colossoma macropomum* in different time of exposure.

Time	Control of DMSO (mL)	Live parasites	Dead parasites	EC ₅₀ (mg/L)	
6h	0.45	30	0		
24 h	0.45	29	0.3 ± 0.5	-	
Time	Control of Tween 80 (mL)	Live parasites	Dead parasites		
6h	1.0	30	0		
24 h	1.0	30	0	-	
Time	Control of distilled water (mL)	Live parasites	Dead parasites		
6h	1.0	30	0		
24 h	1.0	28	0.7 ± 1.1	-	
Time	Emamectin benzoate (mg/L)	Live parasites	Dead parasites	EC ₅₀ (mg/L)	
6 h	12.5	30	0		
	25.0	30	0		
	50.0	30	0		
	100	30	0		
	200	26	1.3 ± 0.6	-	
	300	30	0		
	400	30	0		
	500	30	0		
	600	29	0.3 ± 0.6		
	12.5	30	0		
24 h	25.0	25	1.7 ± 0.6		
	50.0	26	1.3 ± 1.1		
	100	1	9.7 ± 0.6		
	200	0	10.0 ± 0	61.8	
	300	1	9.7 ± 0.6		
	400	1	9.7 ± 0.6		
	500	4	8.7 ± 1.5		
	600	1	9.7 ± 0.6		
	Time	Ivermectin (mg/L)	Live parasites	Dead parasites	EC ₅₀
	6 h	1000	30	0	
1500		30	0		
2000		30	0		
2500		30	0		
3000		30	0		
3500		30	0		
4000		30	0		
4500		30	0		
5000		30	0		
1000		0	0		
24 h	1500	28	0.7 ± 1.1		
	2000	26	1.3 ± 0.6		
	2500	27	1.0 ± 1.0		
	3000	13	5.7 ± 0.6	2900	
	3500	8	7.3 ± 0.6		
	4000	7	7.7 ± 4.0		
	4500	0	10.0 ± 0		
	5000	0	10.0 ± 0		

Table 1. Continued...

Time	Levamisole (mg/L)	Live parasites	Dead parasites	EC ₅₀
6 h	50	30	0	-
	100	19	3.7 ± 1.1	
	150	25	1.7 ± 0.6	
	200	19	3.7 ± 1.5	
	250	20	3.3 ± 1.5	
	300	18	4.0 ± 1.0	
	350	11	6.3 ± 1.5	
	400	8	7.3 ± 0.6	
	450	7	7.7 ± 2.1	
	24 h	50	20	
100		9	7.0 ± 1.0	
150		11	6.3 ± 1.1	
200		11	6.3 ± 1.1	
250		9	7.0 ± 1.0	
300		0	10.0 ± 0	
350		0	10.0 ± 0	
400		0	10.0 ± 0	
450		0	10.0 ± 0	
Time	Praziquantel (mg/L)	Live parasites	Dead parasites	EC ₅₀
6 h	750	30	0	-
	1000	30	0	
	1250	30	0	
	1500	30	0	
	1750	30	0	
	2000	30	0	
	2250	29	0.3 ± 0.6	
	2500	14	5.3 ± 0.6	
	2750	0	10.0 ± 0	
	24 h	750	30	
1000		30	0	
1250		30	0	
1500		29	0.3 ± 0.6	
1750		19	3.7 ± 2.5	
2000		16	4.7 ± 1.1	
2250		5	8.3 ± 1.5	
2500		0	10.0 ± 0	
2750	0	10.0 ± 0		

Table 1. Continued...

Time	Albendazole (mg/L)	Live parasites	Dead parasites	EC ₅₀
6 h	250	30	0	
	500	30	0	
	750	30	0	
	1000	30	0	
	1250	30	0	
	1500	30	0	
	1750	30	0	
	2000	30	0	
	2250	30	0	
	24 h	250	30	0
500		30	0	
750		30	0	
1000		29	0.3 ± 0.6	
1250		29	0.3 ± 0.6	-
1500		28	0.7 ± 0.6	
1750		29	0.3 ± 0.6	
2000		30	0	
2250		27	1.0 ± 1.0	
Time		Mebendazole (mg/L)	Live parasites	Dead parasites
6 h	100	30	0	
	150	30	0	
	200	30	0	
	250	30	0	
	300	30	0	-
	350	30	0	
	400	30	0	
	450	30	0	
	500	30	0	
	24 h	100	30	0
150		29	0.3 ± 0.6	
200		30	0	
250		29	0.3 ± 0.6	
300		28	0.7 ± 1.1	-
350		30	0	
400		30	0	
450		29	0.3 ± 0.6	
500		29	0.3 ± 0.6	

Table 1. Continued...

Time	Fenbendazole (mg/L)	Live parasites	Dead parasites
6 h	0.2	30	0
	0.3	30	0
	0.4	30	0
	0.5	30	0
	0.6	30	0
	0.7	30	0
	0.8	30	0
	0.9	30	0
	1.0	30	0
	24 h	0.2	30
0.3		30	0
0.4		30	0
0.5		30	0
0.6		30	0
0.7		30	0
0.8		30	0
0.9		30	0
1.0		30	0
Time		Loperamide (mg/L)	Live parasites
6 h	20	30	0
	40	30	0
	60	30	0
	80	30	0
	100	30	0
	120	30	0
	140	30	0
	160	30	0
	180	30	0
	24 h	20	29
40		26	1.3 ± 1.1
60		29	0.3 ± 0.6
80		30	0
100		30	0
120		29	0.3 ± 0.6
140		29	0.3 ± 0.6
160		28	0.7 ± 1.1
180		26	1.3 ± 1.5

The concentrations of emamectin benzoate and ivermectin that were used showed high *in vitro* efficacy against *N. buttnerae* of *C. macropomum* after 24h of exposure, but the efficacy of praziquantel and levamisole started at 6 h of *in vitro* exposure (Figure 1). Levamisole showed low efficacy against *N. buttnerae* at 6 h of exposure. Taraschewski et al. (1990) reported that levamisole presented efficacy against *N. rutili* and *E. truttae* after 1 h of exposure. No

concentration of albendazole, fenbendazole, mebendazole or loperamide showed *in vitro* efficacy against *N. buttnerae* of *C. macropomum*, since they are poorly soluble in water, resulting therefore in variable and incomplete bioavailability (Taraschewski et al., 1990; Ibrahim & Al-Anazi, 2013; Romero et al., 2014; Ghanbarzadeh et al., 2016; Pacheco et al., 2018). Similar inefficacy of albendazole, fenbendazole and mebendazole has also been reported in relation to species of acanthocephalans, nematodes, monogeneans and trematodes parasitizing different fish species (Taraschewski et al., 1990; Reimschuessel et al., 2011; Romero et al., 2014; Zhang et al., 2014).

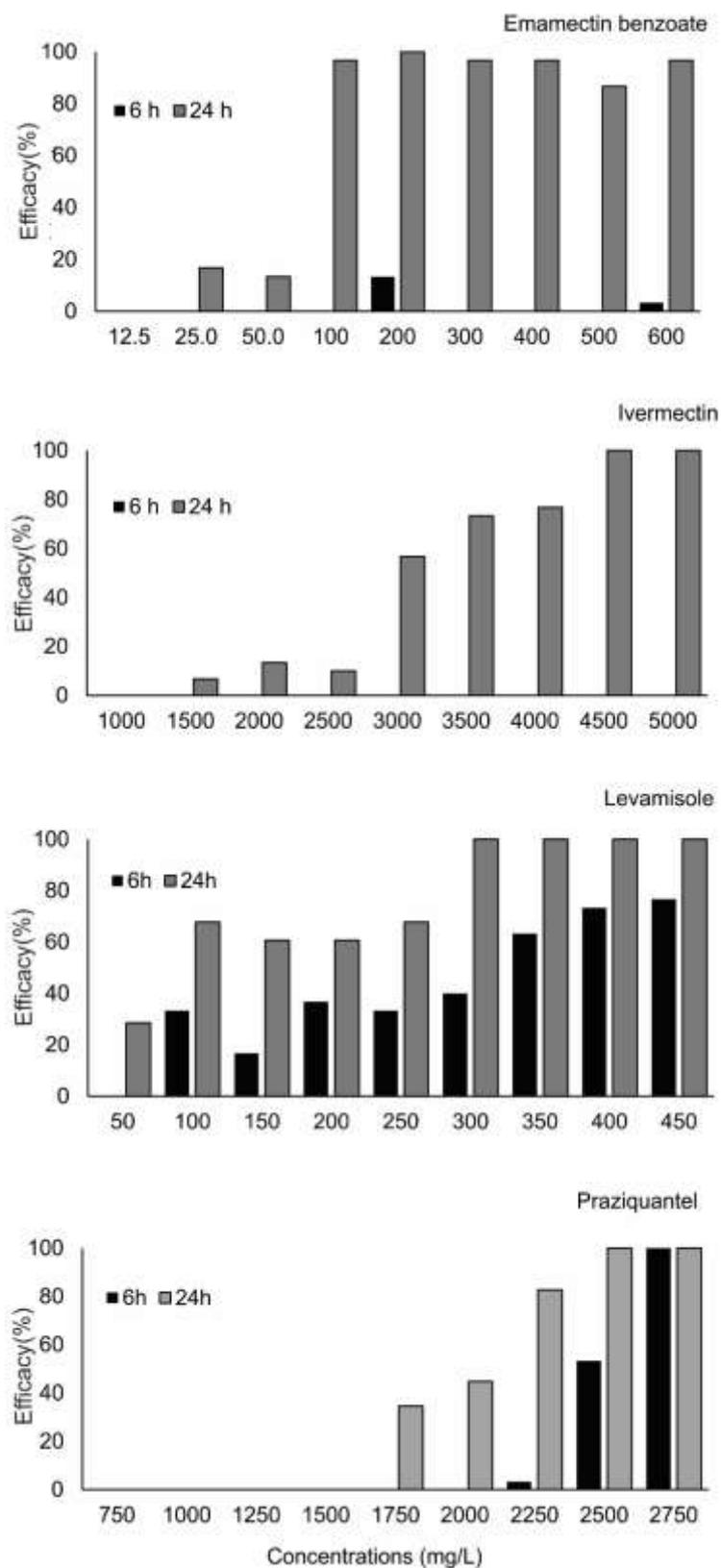


FIGURE 1. Efficacy of the anthelmintics against *Neoechinorhynchus buttnerae* of *Colossoma macropomum* in 6 and 24h of exposure.

Loperamid did not show efficacy against *N. buttnerae* in *C. macropomum* in the present study, contrary to our expectations. However, loperamide was effective against *N. rutili* and *E. truttae*, because it causes contractions and necrosis in acanthocephalans, along with mitochondrial swelling that may result in expulsion of the cytoplasm out of the tegument pores (Taraschewski et al., 1990).

The acanthocephalan *N. buttnerae* of *C. macropomum* presented slow movements only after 6 h of exposure to the highest concentrations of emamectin benzoate, ivermectin and praziquantel. Reimschuessel et al. (2011) also reported that there was a tardy response after *in vitro* exposure of *A. ureteroecetes* to emamectin benzoate and ivermectin. However, Zhang et al. (2014) reported an immediate change in the movement of *Dactylogyrus vastator* after exposure to praziquantel. Praziquantel has a mechanism of action based on depolarization of the tegument of helminth parasites, thus leading to entry of calcium into the cells; hence, causing immobilization, spasmodic contractions and paralysis (Sitja-Bobadilla et al., 2006; Williams et al., 2007; Hardy-Smith et al., 2012).

To conclude, our results showed that 100 mg/L of emamectin benzoate, 300 mg/L of levamisole, 4500 mg/L of ivermectin and 2500 mg/L of praziquantel had the highest efficacy against *N. buttnerae*. These concentrations can be recommended for use in the diet of *C. macropomum* after previous evaluation of the toxicity. Therefore, these first results represent a great step forward regarding integrated management for controlling *N. buttnerae* in farmed *C. macropomum*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for the productivity research grant awarded to M. Tavares-Dias (# 303013/2015-0) and Acanto project from Embrapa.

ETHICAL DISCLOSURES

This study was developed in accordance with the principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and authorization from Ethics Committee in the Use of Animal of the Embrapa Amazônia Ocidental (Nº 02/2017) was carried out.

REFERENCES

- Collymore, C., V. Watral, J. R. White, M. E. Colvin, S. Rasmussen, R. J. Tolwani, & M. L. Kent. (2014). Tolerance and efficacy of emamectin benzoate and ivermectin for the Treatment of *Pseudocapillaria tomentosa* in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 11, 490–497.
- Ghanbarzadeh, S., Khalili, A., Jouyban, A., Emami, S., Javadzadeh, Y., Solhi, M., &

- Hamishehkar H. (2016). Dramatic improvement in dissolution rate of albendazole by a simple, one-step, industrially scalable technique. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(6), 435-444. doi: 10.4103/1735-5362.194868
- Hamilton, M. A.; Russo, R. C.; Thurston, R. V. (1977). Trimmed spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11, 714-719. Correction: 12: 417.
- Hardy-Smith, P., Ellis, D., Humphrey, J., Evans, M., Evans, D., Rough, K., Valdenegro, V., & Nowak, B. (2012). *In vitro* and *in vivo* efficacy of anthelmintic compounds against blood fluke (*Cardicola forsteri*). *Aquaculture*, 334–337, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.037>
- Ibrahim, M. A., & Al-Anazi, F. K. (2013). Enhancement of the dissolution of albendazole from pellets using MTR technique. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 215–223.
- Jerônimo, G. T., Pádua, S. B., Belo, M. A. A., Chagas, E. C., Taboga, S. R., Maciel, P. O., & Martins M. L. (2017). *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. *Aquaculture*, 469, 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.027>
- Lourenço, F. S., Morey, G. A. M., Pereira, J. N., & Malta, J. C. O. (2017). Ocorrência de *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *buttnerae* Golvan, 1956 (Acantocephala: Neoechinorhynchidae) em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Characiformes: Serrasalminidae) provenientes de uma piscicultura da Amazônia brasileira. *Folia amazônica*, 26 (1), 1-8. doi: <https://doi.org/10.24841/fa.v26i1.41>
- Lourenço, F. S., Morey, G. A. M., Pereira J. N., & Malta J. C. O. (2018). The development of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) in its intermediate host *Cypridopsis vidua* in Brazil. *Acta Parasitologica*, 63(2), 354–359. doi: 10.1515/ap-2018-0040.
- Matos, L. V., Oliveira M. I. B., Gomes A. L. S., & Silva G. S. (2017). Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitology Research*, 116, 1029–1037. doi: 10.1007/s00436-017-5384-3. Epub 2017 Jan 26.
- Pacheco, P.A, Rodrigues, L.N.C, Ferreira, J.F.S., Gomes, A.C.P., Veríssimo, C.J., Louvandini H., Costa, R.L.D., & Katiki L.M. (2018). Inclusion complex and nanoclusters of cyclodextrin to increase the solubility and efficacy of albendazole. *Parasitology Research*, 117(3):705-712. doi: 10.1007/s00436-017-5740-3. Epub 2018 Jan 11.

- Reimschuessel, R., Giesecker C., & Poynton, S. (2011). *In vitro* effect of seven antiparasitic on *Acolpenteron ureteroecetes* (Dactylogyridae) from largemouth bass *Micropterus salmoides* (Centrarchidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 94, 59–72.
- Romero, M. C., Navarro. M. C., Sanchez, J. M., & Valero, A. (2014). Peppermint (*Mentha piperita*) and albendazole against anisakiasis in an animal model. *Tropical Medicine and International Health*, 19, 1430–1436. doi: 10.1111/tmi.12399. Epub 2014 Oct 20.
- Shinn, A.P., & Bron, J.E. (2012). Considerations in the use of anti-parasitic drugs in aquaculture. In: Austin, B.A. *Infectious disease in aquaculture prevention and control* (pp. 190-217). Woodhead Publishing Limited, UK. doi: 10.1533/9780857095732.2.190
- Silva-Gomes, A. L., Coelho-Filho, J. G., Viana-Silva, W., Braga-Oliveira, M. I., Bernardino G., & Costa J. I. (2017). The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neochinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), reared in ponds. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(2), 496-500. <http://dx.doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-25>
- Sitja-Bobadilla, A., Felipe, M. C., & Alvarez-Pellitero, P. (2006). *In vivo* and *in vitro* treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261, 856–864. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.012>
- Taraschewski, H., Mehlhorn, H., & Raether, W. (1990). Loperamid, an efficacious drug against fish-pathogenic acanthocephalans. *Parasitology research*, 76, 619–623.
- Williams, R.E., Ernst, I., Chambers, C.B., & Whittington, I.D. (2007). Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriola* and *Benedenia seriola* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77, 199–205
- Zhang, X. P., Li, W. X., Ai. T. S., Zou H., Wu, S. G., & Wang, G. T. (2014). The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture*, 420–421, 302–307.
- Zuskova, E., Piackova, V., Machova, J., Chupani, L., Steinbach, C., Stara, A., Velisek, J. (2018). Efficacy and toxicity of praziquantel in helminth-infected barbel (*Barbus barbus* L.). *Journal of Fish Diseases*, 41(4), 643-649. doi: 10.1111/jfd.12764. Epub 2018 Jan 19.

ARTIGO 2**Efeitos da suplementação do levamisol e ivermectina na dieta de *Colossoma macropomum* (Pisces: Serassalmidae): toxicidade, hematologia e imunidade inata**

Publicado no periódico Diseases of Aquatic Organisms

Efeitos da suplementação do levamisol e ivermectina na dieta de *Colossoma macropomum* (Pisces: Serassalmidae): toxicidade, hematologia e imunidade inata

Lígia Carvalho Dias Oliveira¹, Alexandre Renato Pinto Brasiliense¹, Márcia Kelly Reis Dias¹, Eliane Tie Oba Yoshioka², Marcos Tavares-Dias^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBio), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Rodovia Juscelino Kubitschek S/N, Universidade, 68903-419, Macapá, Amapá, Brazil.

² Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 5, no. 2600, Universidade, CEP 68903-419, Macapá, AP, Brazil

* Corresponding author: marcos.tavares@embrapa.br

RESUMO

Este estudo investigou a toxicidade, hematologia e imunidade inata de *Colossoma macropomum* suplementados na dieta com levamisol e ivermectina. Os peixes foram alimentados, durante 24, 96 e 240 horas, com dietas contendo 300, 600, 900 e 1200 mg/kg de levamisol e 4.500, 9.000, 13.500 e 18.000 mg/kg de ivermectina. Todas as concentrações de ivermectina causaram 100% de mortalidade dos peixes dentro de 10 horas, mas nenhuma concentração de levamisol causou mortalidade ou alteração no comportamento dos peixes durante de 10 dias de alimentação. Não houve alteração no número de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, CHCM e albumina em todos os tratamentos com levamisol, após 24, 96 e 240 horas de alimentação. Porém, após 24 horas de alimentação com levamisol, o VCM dos peixes que receberam 900 mg/kg aumentou em relação aos controles. Além disso, as concentrações de 900 e 1.200 mg/kg causaram diminuição nas taxas de albumina: globulina quando comparadas aos controles e tratamentos com 300 e 600 mg/kg. Após 96 horas, os níveis de glicose e proteína total plasmática aumentaram nos peixes alimentados com 600, 900 e 1200 mg/kg quando comparados aos controles e tratamento com 300 mg/kg. O burst respiratório de leucócitos nos peixes alimentados com 900 mg/kg de levamisol aumentou. Após 10 dias de alimentação com levamisol, houve aumento nos níveis de globulina dos peixes que receberam 600 mg/kg quando comparados aos controles, e a atividade respiratória de leucócitos também aumentou nos peixes suplementados com 900 e 1.200 mg/kg quando comparados aos controles e demais tratamentos. Finalmente, altas concentrações de ivermectina na dieta de *C. macropomum* não são toleradas, mas de levamisol são bem toleradas. Este primeiro estudo sobre a alimentação com estes fármacos forneceu informações importantes sobre a efetividade do levamisol no sistema imune e indica que qualquer uma das concentrações testadas pode ser usada na dieta de *C. macropomum* para tratamentos antiparasitários.

Palavras-chave: anti-helmínticos, aquicultura, dieta, sangue, tolerância

INTRODUÇÃO

Globalmente, a piscicultura é o setor de alimentos mais dinâmico e com as maiores taxas anuais de crescimento nas últimas décadas. Esta atividade de cultivo de peixes também aumentou em termos de impacto social e econômico, devido a contribuição da produção de alimentos para subsistência e geração de renda para populações de diversas regiões do mundo (FAO 2018). A expansão da indústria da piscicultura levou ao aumento das parasitoses devido a um grande número de estressores (e.g. baixa qualidade de água, elevada densidade, manipulação, reprodução e transporte) que afetam negativamente a saúde dos peixes (Tavares-Dias & Martins 2017, Pahor-Filho et al. 2017).

As doenças são uma grande preocupação na piscicultura mundial, pois causam prejuízos econômicos globais estimados em US\$ 1,05-9,58 bilhões/ano (Shinn et al. 2012). Portanto, há um crescente interesse não apenas em compreender as doenças, mas também encontrar drogas de baixo custo e com eficácia que possam ser administradas na dieta dos peixes, para controlar e tratar parasitoses causadas por espécies de helmintos.

Em peixes, para reduzir infecções por monogeneas, nematoides, digeneas e acantocéfalos tem sido usado diversas drogas anti-helmínticas, incluindo levamisol e ivermectina (Athanasopoulou et al. 2002, Mladineo et al. 2006, Pahor-Filho et al. 2017, Oliveira et al. 2019). Ivermectina é uma das avermectinas com amplo espectro antihelmíntico que tem sido amplamente usada no controle de helmintos (Morales-Serna et al. 2018, Oliveira et al. 2019) e crustáceos parasitos de peixes (Palmer et al. 1996, Athanasopoulou et al. 2002, Mladineo et al. 2006). Porém, a ivermectina pode causar mortalidade nos peixes devido a toxicidade, causando neurotoxicidade com degeneração de neurônios e hepatotoxicidade com necrose e hepatite aguda, além de diminuição do crescimento corporal e alterações comportamentais (Johnson et al. 1993, Palmer et al. 1996, Katharios et al. 2002, Athanasopoulou et al. 2002, Mladineo et al. 2006, Thiripurasundari et al. 2010, Varó et al. 2010, Ucán-Marín et al. 2012).

Levamisol, um anti-helmíntico do grupo dos imidotiazóis, tem sido usado com eficácia no controle de espécies de helmintos parasitos (Pahor-Filho et al. 2017) e para estimular a imunidade e crescimento dos peixes suplementados na dieta (Mulero et al. 1998, Li et al. 2006, Maqsood et al. 2009, Zanon et al. 2014, Bhatnagar & Lamba 2016, Biller-Takahashi et al. 2016). Essa droga imobiliza o parasito, causando uma paralisia muscular (Pahor-Filho et al., 2017). Porém, altas doses de levamisol na dieta podem causar toxicidade aos peixes (Li et al. 2006, Pahor-Filho et al. 2017).

Como essas alterações causadas pela ivermectina e levamisol podem resultar em alta mortalidade de peixes, que é uma consideração importante para os produtores de peixes, requerem avaliação prévia da tolerância das concentrações terapêuticas desses anti-helmínticos na dieta dos animais, para o desenvolvimento da estratégia terapêutica que garanta a segurança no tratamento em campo (Johnson et al. 1993, Pahor-Filho et al. 2017).

Como *Collossoma macropomum*, um Serrasalminidae de grande importância na aquicultura da Amazônia, é frequentemente infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae* (Neoechinorhynchidae), um endoparasito que causa grandes perdas econômicas na piscicultura, Oliveira et al. (2019) determinaram as concentrações de levamisol e ivermectina com eficácia no controle *in vitro* dessa espécie de endoparasito. Porém, como a tolerância das concentrações de levamisol e ivermectina não foram ainda determinadas para *C. macropomum*, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade desses dois fármacos para esse peixe, analisando a tolerância, hematologia e imunidade, após a alimentação com diferentes concentrações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Peixes e aclimação

Seiscentos alevinos de *Collossoma macropomum* (± 40 g) foram obtidos de uma piscicultura comercial de Macapá, estado do Amapá (Brasil) e mantidos no Laboratório de Aquicultura e Pesca da Embrapa Amapá, Macapá. No laboratório, os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanques de PVC de 500L, com água e aeração constantes, e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 32% proteína bruta (Guabi, Brasil). Nos tanques, os parâmetros da água foram monitorados: temperatura 30.1 ± 0.1 °C, oxigênio dissolvido 5.6 ± 0.2 mg l⁻¹, pH 5.4 ± 0.2 , amônia total 0.5 ± 0.01 mg l⁻¹, alcalinidade 10.0 ± 0 mg l⁻¹ e dureza 10.0 ± 0 mg l⁻¹. Estes peixes foram usados para todos ensaios com dietas suplementadas com levamisol e ivermectina.

Preparo das rações experimentais contendo os anti-helmínticos

Levamisol (Ripercol 150 F[®] na concentração de 18,8%) foi diluído com água destilada e misturado a uma ração comercial de 32% proteína bruta (Guabi, Brasil), em quatro concentrações (300, 600, 900 e 1.200 mg/kg). Ivermectina (Ivemic Supreme[®] na concentração de 3.5%) foi adicionada diretamente na ração comercial de 32% proteína bruta (Guabi, Brasil) em quatro concentrações (4.500, 9.000, 13.500 e 18.000 mg/kg). Estas concentrações de levamisol e ivermectina definidas a partir de estudos *in vitro* (Oliveira et al., 2019).

Tolerância de *Collossoma macropomum* alimentados com os anti-helmínticos

Alevinos de *C. macropomum* (14.2 ± 1.1 cm e 44.0 ± 13.0 g) foram distribuídos aleatoriamente em tanques de 100 L, com três réplicas por tratamento, quinze peixes em cada

réplica e em um total de 45 peixes por tratamento. Os peixes foram alimentados *ad libitum* e duas vezes ao dia, com as dietas contendo 0, 300, 600, 900 e 1.200 mg/kg de levamisol e 0, 4.500, 9.000, 13.500 e 18.000 mg/kg de ivermectina, durante 240 horas. Os controles receberam somente dieta comercial sem qualquer anti-helmíntico.

Os tanques foram mantidos com água e aeração contínua e os parâmetros de qualidade da água foram monitorados (temperatura 30.1 ± 0.1 °C, oxigênio dissolvido 5.5 ± 0.2 mg l⁻¹, pH 5.3 ± 0.2 , amônia total $0,5 \pm 0,01$ mg l⁻¹, alcalinidade 10.0 ± 0.01 mg l⁻¹ e dureza 10.0 ± 0.01 mg l⁻¹).

Parâmetros sanguíneos e atividade respiratória de leucócitos

Após 24, 96 e 240 h de alimentação com as dietas contendo 0, 300, 600, 900 e 1.200 mg/kg de levamisol, 5 peixes de cada repetição dos tratamentos (15 por tratamento) com foram usados para coleta de sangue por punção do vaso caudal, com o auxílio de seringas contendo EDTA (10%). O sangue foi dividido em duas aliquotas. Um aliquota de 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) (Ranzani-Paiva et al. 2013).

O burst respiratório de leucócitos foi determinado de acordo com método previamente descrito (Sahoo et al., 2005; Biller-Takahashi et al., 2013) e a densidade ótica (OD) do sobreadante foi realizada em 540 nm usando espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Paraná, Brasil).

A segunda aliquota de sangue foi centrifugada a 75 G, durante 5 min (Centrifuga Mod. 5424, Hamburgo, Alemanha) e usada para obtenção do plasma, para determinação das concentrações de glicose, albumina e proteína total utilizando kits colorimétricos (Labtest, MG, Brasil) para cada finalidade e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Brasil). A globulina foi determinada a partir da diferença dos níveis de proteína total e albumina. A ratio albumina/globulina (A:G) foi calculada dividindo os valores de albumina pelos valores de globulina (Misra et al. 2009).

Análises estatísticas

Todos os dados foram avaliados nas hipóteses de normalidade e homocedasticidade usando Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Como os dados não apresentaram uma distribuição normal foram analisados usando Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparação entre medianas (Zar 2010).

RESULTADOS

Todas as concentrações de ivermectina (4.500, 9.000, 13.500 e 18.000 mg/kg) causaram inicialmente letargia e sinais de hipóxia em *Colossoma macropomum*, seguido de 100% de mortalidade dentro de 10 horas de alimentação. Porém, nenhuma concentração de levamisol (300, 600, 900 e 1.200 mg/kg) causou qualquer mortalidade ou alteração comportamental em 240 horas de alimentação.

Após 24 horas de alimentação com 300 mg/kg de levamisol, o hematócrito diminuiu ($p > 0.05$) em relação aos peixes alimentados com 600 mg/kg. A concentração de hemoglobina nos peixes alimentados com 300 mg/kg foi menor ($p < 0.05$) que nos peixes alimentados com 600 e 900 mg/kg. O VCM nos peixes alimentados 900 mg/kg de levamisol foi maior ($p < 0.05$) que nos controles e o CHCM foi menor ($p < 0.05$) nos peixes que receberam 600 mg/kg, quando comparado aos que receberam 900 mg/kg (Tabela 1). Nos peixes alimentados com 600, 900 e 1200 mg/kg de levamisol, os níveis de proteína total aumentaram ($p < 0.05$) em relação aos alimentados com 300 mg/kg e glicose plasmática aumentou ($p < 0.05$) nos peixes alimentados com 600, 900 e 1200 mg/kg em relação aos controles, após 24 horas. Os níveis de globulinas aumentaram ($p < 0.05$) nos peixes alimentados com 600 e 900 mg/kg de levamisol quando comparados aos alimentados com 300 mg/kg e o burst respiratório de leucócitos diminuiu ($p < 0.05$) nos peixes que receberam 300 e 900 mg/kg, quando comparados aos controles (Figura 1).

Em 96 horas de alimentação, houve uma diminuição ($p < 0.05$) na taxa A:G dos peixes que receberam 900 e 1.200 mg/kg de levamisol, quando comparados aos controles e 300 e 600 mg/kg (Tabela 1). Os níveis de proteínas totais aumentaram ($p < 0.05$) nos peixes alimentados com 900 mg/kg quando comparados aos alimentados com 300 mg/kg. Os níveis de glicose nos peixes alimentados com 600, 900 e 1200 mg/kg de levamisol foram maiores ($p < 0.05$) que nos peixes alimentados com 300 mg/kg, enquanto os níveis de globulina foram maiores ($p < 0.05$) nos peixes que receberam 900 mg/kg, quando comparados aos que receberam 300 mg/kg do produto na dieta. O burst respiratório de leucócitos aumentou ($p < 0.05$) nos peixes alimentados com 900 mg/kg de levamisol quando comparados aos controles e grupo com 300 e 600 mg/kg (Figura 2).

Após 240 horas de alimentação, houve um aumento do VCM dos peixes que receberam 1200 mg/kg de levamisol quando comparados aos que receberam 600 mg/kg (Tabela 1). Nos peixes alimentados com 600 e 900 mg/kg de levamisol houve aumento ($p < 0.05$) nos níveis de proteínas totais quando comparados aos peixes controles, enquanto nos peixes alimentados com 300 mg/kg houve redução nos níveis de glicose em relação aos demais tratamentos. Os níveis

de globulinas aumentaram nos peixes alimentados com 600 mg/kg de levamisol quando comparados os controles e aqueles alimentados com 300 e 1200 mg/kg. O burst respiratório de leucócitos nos peixes alimentados com 900 e 1200 mg/kg de levamisol aumentou quando comparado aos demais tratamentos (Figura 3).

Tabela 1. Parâmetros sanguíneos de *Colossoma macropomum* alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol.

Tratamentos	Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)	Albumina (mg/dL)	A: G ratio
Após 24 h							
0 mg/kg	1.25 ± 0.19 ^a	20.4 ± 4.7 ^{ab}	5.5 ± 0.9 ^{ab}	162.0 ± 25.3 ^a	27.9 ± 3.8 ^{ab}	1.2 ± 0.8 ^a	0.9 ± 1.4 ^a
300 mg/kg	1.13 ± 0.180 ^a	19.4 ± 3.3 ^a	5.1 ± 1.0 ^a	172.7 ± 18.5 ^{ab}	26.1 ± 2.2 ^{ab}	0.7 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.8 ^a
600 mg/kg	1.29 ± 0.24 ^a	23.8 ± 3.4 ^b	6.0 ± 1.0 ^b	186.1 ± 19.7 ^{ab}	25.4 ± 2.2 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.2 ^a
900 mg/kg	1.10 ± 0.17 ^a	21.2 ± 2.6 ^{ab}	6.1 ± 0.8 ^b	193.6 ± 32.5 ^b	29.3 ± 4.4 ^b	0.9 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.4 ^a
1200 mg/kg	1.26 ± 0.23 ^a	22.6 ± 3.9 ^{ab}	5.8 ± 0.6 ^{ab}	180.3 ± 26.9 ^{ab}	26.3 ± 4.1 ^{ab}	1.5 ± 1.1 ^a	0.7 ± 0.9 ^a
Após 96 h							
0 mg/kg	1.21 ± 0.13 ^a	21.9 ± 1.6 ^a	5.7 ± 0.6 ^a	183.8 ± 24.0 ^a	25.9 ± 2.3 ^a	1.3 ± 0.7 ^a	0.9 ± 0.9 ^a
300 mg/kg	1.29 ± 0.30 ^a	23.4 ± 2.2 ^a	5.6 ± 0.6 ^a	187.0 ± 30.2 ^a	23.8 ± 1.7 ^a	0.8 ± 0.5 ^a	1.0 ± 1.0 ^a
600 mg/kg	1.23 ± 0.20 ^a	22.2 ± 2.7 ^a	5.6 ± 0.7 ^a	182.6 ± 23.5 ^a	25.3 ± 1.8 ^a	1.2 ± 1.2 ^a	1.2 ± 2.5 ^a
900 mg/kg	1.28 ± 0.22 ^a	21.8 ± 2.7 ^a	5.5 ± 0.7 ^a	172.5 ± 23.2 ^a	25.1 ± 2.1 ^a	0.9 ± 0.3 ^a	0.4 ± 0.1 ^b
1200 mg/kg	1.36 ± 0.17 ^a	22.8 ± 2.8 ^a	5.6 ± 0.8 ^a	168.0 ± 14.6 ^a	24.5 ± 2.9 ^a	1.1 ± 0.3 ^a	0.5 ± 0.2 ^b
Após 240 h							
0 mg/kg	1.32 ± 0.21 ^a	23.5 ± 2.3 ^a	6.5 ± 1.0 ^a	182.4 ± 33.8 ^{ab}	27.7 ± 3.7 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.1 ^a
300 mg/kg	1.32 ± 0.17 ^a	23.0 ± 2.9 ^a	5.6 ± 0.8 ^a	175.2 ± 16.0 ^{ab}	24.4 ± 2.8 ^a	0.9 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.1 ^a
600 mg/kg	1.32 ± 0.22 ^a	22.4 ± 3.0 ^a	6.2 ± 1.1 ^a	172.6 ± 24.9 ^a	27.3 ± 2.7 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.05 ^a
900 mg/kg	1.33 ± 0.19 ^a	23.4 ± 2.8 ^a	6.2 ± 0.7 ^a	178.3 ± 26.2 ^{ab}	26.8 ± 3.6 ^a	0.9 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.1 ^a
1200 mg/kg	1.21 ± 0.16 ^a	23.9 ± 1.8 ^a	6.3 ± 0.9 ^a	200.3 ± 20.3 ^b	26.3 ± 3.0 ^a	0.9 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.1 ^a

VCM: Volume corpuscular médio; CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média, A:G: Albumin: globulin ratio. Valores seguidos da mesma letra, entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p > 0.05$)

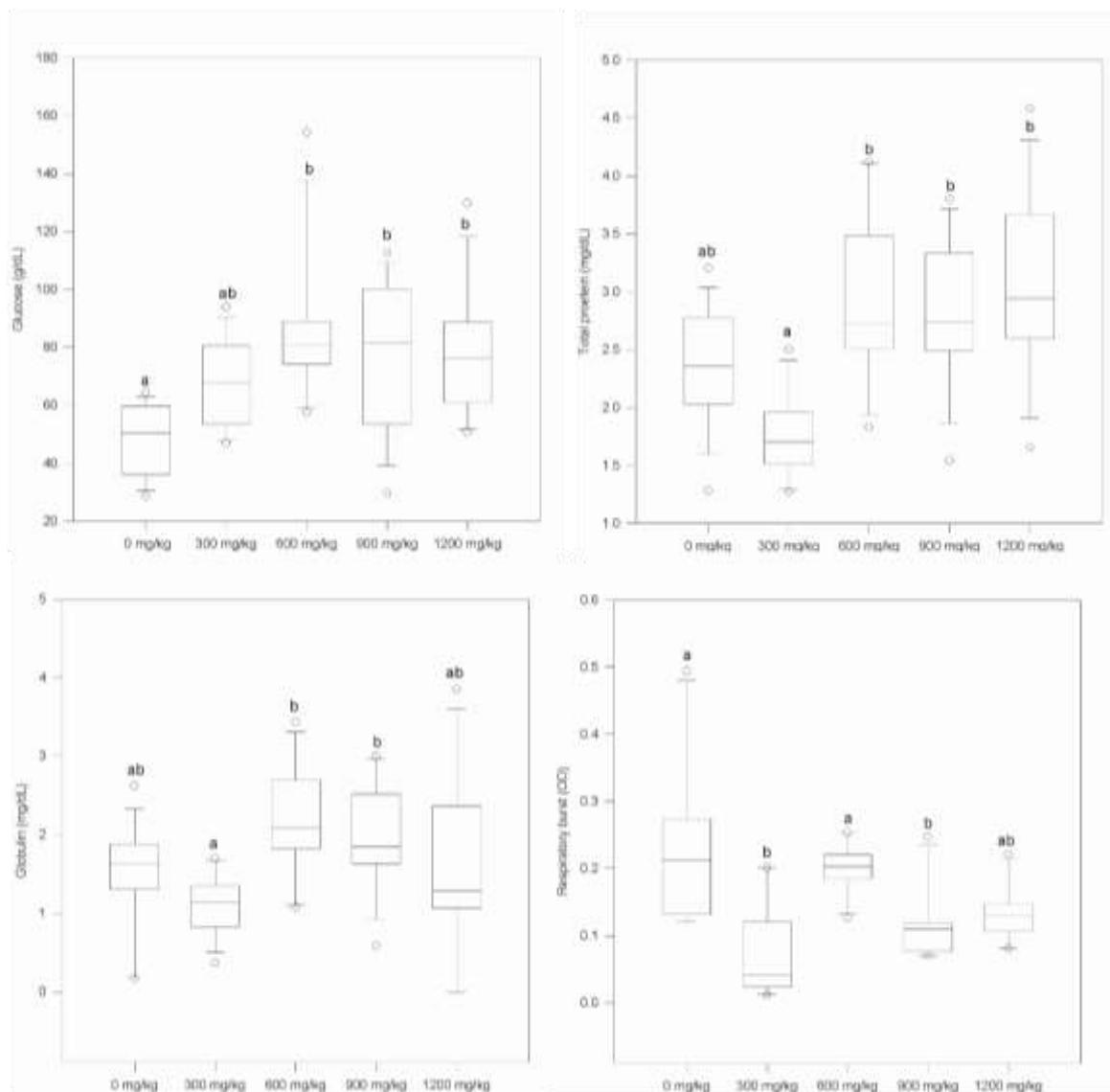


Figura 1. Parâmetros sanguíneos e imunológicos *Colossoma macropomum* após 24 horas da alimentação com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (Box plots representam medianas, intervalos interquartis, mínimo-máximo e outliers). Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p > 0.05$).

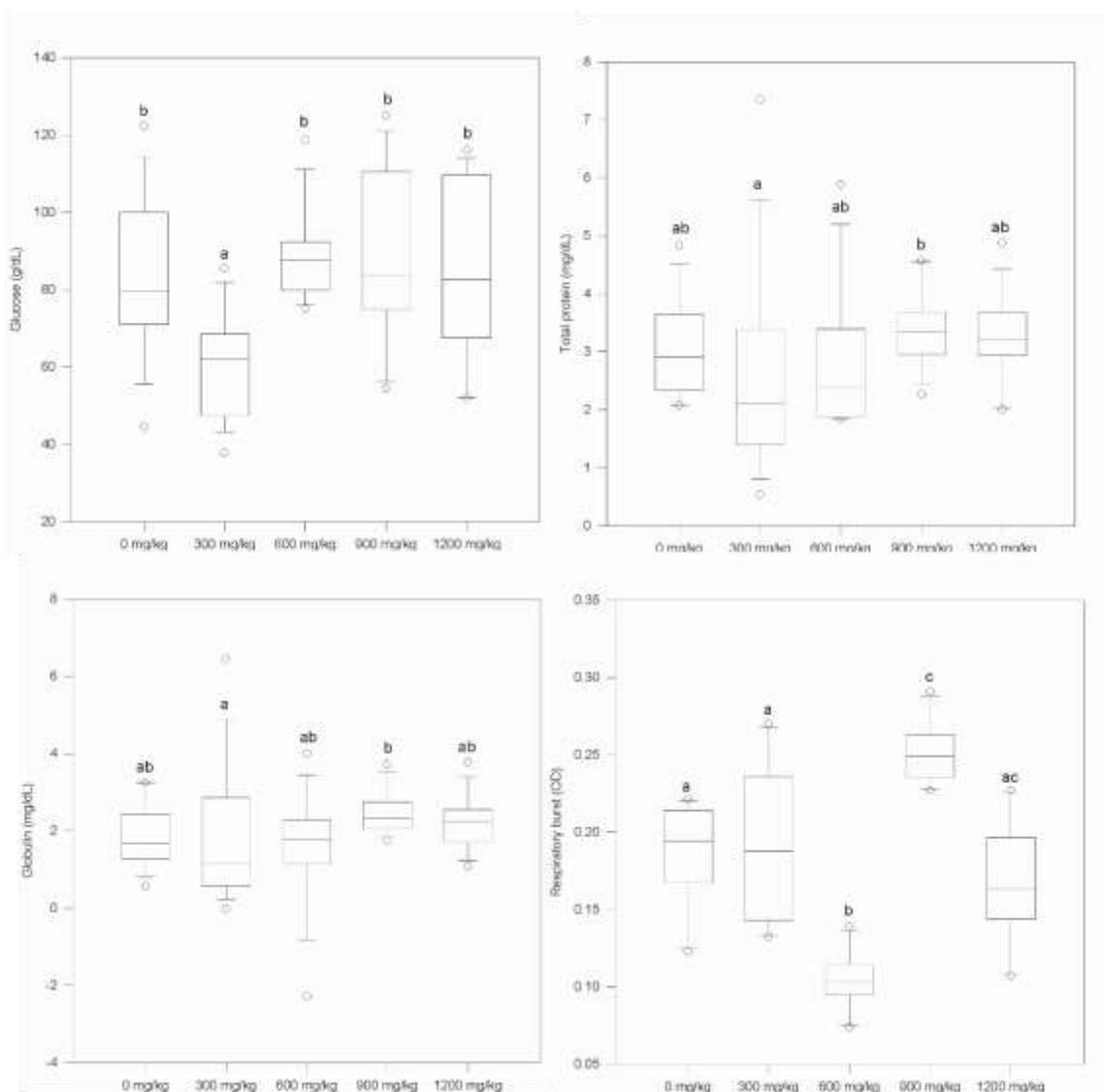


Figura 2. Parâmetros sanguíneos e imunológicos *Colossoma macropomum* após 96 horas da alimentação com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (Box plots representam medianas, intervalos interquartis, mínimo-máximo e outliers). Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p > 0.05$).

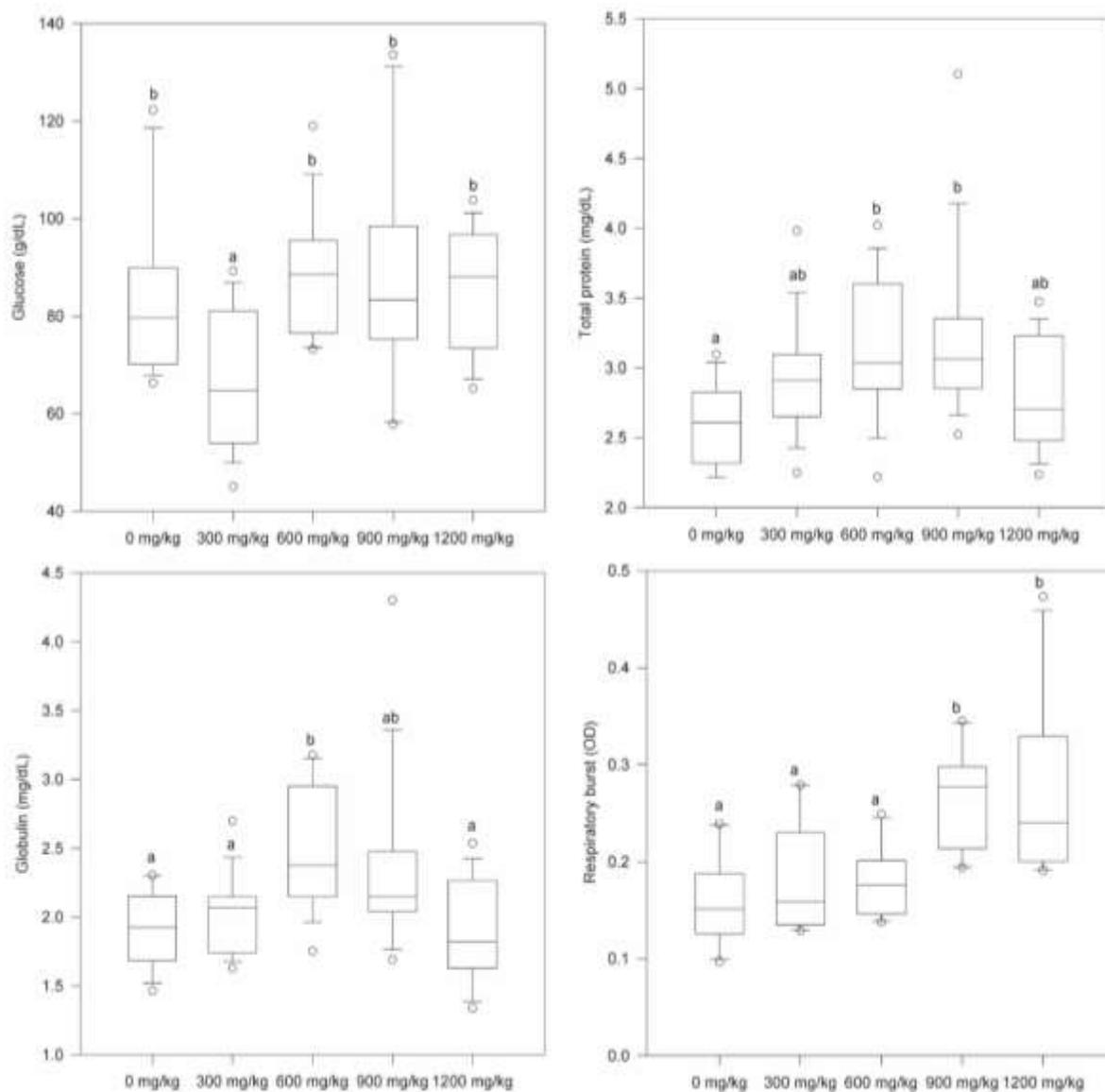


Figura 3. Parâmetros sanguíneos e imunológicos *Collossoma macropomum* após 240 horas da alimentação com dietas suplementadas com diferentes concentrações de levamisol (Box plots representam medianas, intervalos interquartis, mínimo-máximo e outliers). Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p > 0.05$).

DISCUSSÃO

Taxas reduzidas de sobrevivência é um dos problemas que os piscicultores enfrentam, especialmente nos estágios iniciais de vida dos peixes, devido as doenças parasitárias. Para controlar doenças causadas por helmintos parasitos, diferentes anti-helmínticos podem ser utilizados (Mladineo et al. 2006, Palmer et al. 1996, Athanassopoulou et al. 2002, Pahor-Filho et al. 2017), mas a tolerância dos peixes é dependente principalmente da droga, concentração e tempo de exposição. Portanto, considerando a indisponibilidade de tratamentos adequados para muitas doenças parasitárias de *Colossoma macropomum*, principalmente causadas por helmintos, a busca por medidas de controle merece atenção.

Como 300 mg/L de levamisol demonstrou eficácia *in vitro* contra *N. buttnerae* de *C. macropomum* (Oliveira et al. 2019), nós avaliamos a toxicidade de 300-1200 mg/L como aditivo alimentar; e foi boa a tolerância dos peixes, uma vez que nenhuma mortalidade ocorreu. Similarmente, Pahor-Filho et al. (2017) relataram boa tolerância de *Piaractus mesopotamicus* a alimentação com 300 mg/L de levamisol.

Embora 4500 mg l⁻¹ de ivermectina tem sido recomendada para uso *in vitro* contra acantocéfalos de *C. macropomum* (Oliveira et al. 2019), nós observamos que elevadas concentrações (4500-18.000 mg/kg) foram altamente tóxicas para esse peixe, causando 100% de mortalidade dentro de 10 h de alimentação. Para espécies de salmonídeos, dose única de 0.1 mg/kg de ivermectina, na dieta por semana, tem disso recomendada para tratamento contra crustáceos parasitos, pois concentrações maiores são tóxicas para os peixes, levando a elevada mortalidade de hospedeiros (Johnson et al. 1993, Palmer et al. 1996). *Salmo salar* alimentados com 0.05 e 0.25 mg/kg de ivermectina também tiveram letargia e 70% de mortalidade após 30 dias de alimentação com essa maior concentração (Ucán-Marín et al. 2012). Alimentação de *Danio rerio* com 0.1 mg/kg de ivermectina causou letargia e dificuldade respiratória em 20% dos peixes e 24% de mortalidade em quatro semanas de alimentação, devido a neurotoxicidade e hepatotoxicidade (Mladineo et al. 2006, Thiripurasundari et al. 2010, Varó et al. 2010, Collymore et al. 2014, Thiripurasundari et al. 2014). Porém, em *Sparatus aurata* alimentados com 100, 200, 400 e 800 µg/kg de ivermectina não houve mortalidade ou alterações histopatológicas, mas letargia, perda de apetite e escurecimento da pele foram alterações observadas nos peixes alimentados com as maiores concentrações após 35 dias de tratamento (Katharios et al. 2002). Portanto, esses resultados sugerem que somente baixas concentrações de ivermectina são toleradas na dieta dos peixes.

Parâmetros hematológicos podem ser utilizados como índices do estado de saúde para detectar efeitos potenciais de agentes anti-nutricionais e resposta ao estresse nos peixes (Barton

& Iwama 1991, Ranzani-Paiva et al. 2013). A resposta ao estresse é caracterizada pela secreção de catecolaminas, cortisol e glicose plasmática, levando à mobilização de energia e hemoconcentração ou hemodiluição, devido as alterações nas concentrações de íons plasmáticos (Barton & Iwama 1991, Kansari et al. 2017). Em *C. macropomum*, aumento dos níveis de glicose plasmática ocorreu somente nos peixes alimentados com dieta contendo 600, 900 e 1200 mg de levamisol após 24 h, bem como aumento do hematócrito nos peixes alimentados com 600 mg/kg, e VCM nos peixes alimentados com 900 g/kg de levamisol, indicando estresse no início da alimentação com esta droga antihelmitica.

Porém, os níveis de glicose diminuíram em *Labeo rohita* suplementados com 125-500 mg/kg após 56 dias de alimentação (Misra et al. 2009). Em *Labeotrophus fuelleborni* a alimentação com 2 mg/kg de levamisol durante 2 semanas, aumentou o número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (Amiri & Bahrekazemi 2017). Em *Cirrhinus mrigala*, após 60 dias de alimentação com 150-500 mg/kg de levamisol foi relatado aumento no número de eritrócitos (Bhatnagar & Lamba 2016). Por outro lado, em *P. mesopotamicus* alimentados com 125-500 mg/kg de levamisol, durante 15 dias, não houve alterações no número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM (Biller-Takahashi 2016). Sado et al. (2010) não observaram alteração nos níveis de hemoglobina e CHCM em *P. mesopotamicus* alimentados com 50-800 mg/kg de levamisol, mas os níveis de glicose aumentaram nos peixes que receberam com 800 mg/kg desta droga na dieta. Portanto, a administração prolongada de concentrações moderadas de levamisol não resultam em distúrbios das funções fisiológicas tais como os parâmetros eritrocitários.

Como o plasma sanguíneo é constituído de várias proteínas, as quais são uma mistura principalmente de albumina, globulina e fibrinogênio; a albumina e globulina mantêm o equilíbrio hídrico entre o sangue e tecidos. Portanto, as proteínas plasmáticas servem como fonte de nutrição para os tecidos corporais e podem ser alteradas por condições de estresse (Siddiqui 1977, Sado et al. 2010, Zanon et al. 2014). Em *C. macropomum*, as concentrações de proteína total aumentaram após 10 dias de alimentação com 600 e 900 mg/kg de levamisol, bem como os níveis de globulinas nos peixes alimentados com 600 mg/kg. Similarmente, os níveis de proteínas totais e globulinas aumentaram em *L. rohita* suplementados com 125-500 mg/kg após 28 dias de alimentação (Misra et al. 2009). Porém, em *P. mesopotamicus* alimentados com 50-800 mg/kg de levamisol não foi relatada alterações nos níveis de proteínas totais, mas os níveis reduziram após 45 dias em relação ao 15 dia de suplementação com esta droga (Sado et al. 2010). Alimentação de *Pseudoplatystoma reticulatum*, durante 30 dias, com

50-500 mg/kg não influenciou nos níveis proteínas totais e globulina (Zanon et al. 2014). Portanto, essa influência do levamisol é dependente das concentrações e tempo de alimentação.

O burst respiratório de leucócitos é um indicador da imunidade inata dos peixes. Seu aumento é indicativo de uma boa resposta inflamatória e alta taxa de fagocitose seguido de um intenso consumo de oxigênio, que podem melhorar a resistência dos peixes a infecções e ao estresse (Sahoo et al. 2005, Biller-Takahashi et al. 2013, Rebl & Goldammer 2018). A ação do levamisol no sistema imune não está esclarecida, mas em *C. macropomum* alimentados com 300 e 900 mg/kg de levamisol houve redução no burst respiratório de leucócitos após 24 h, bem como após 96 h nos de alimentação com 600 mg/kg, mas foi observado aumento no burst respiratório de leucócitos após 96 h da alimentação com 900 mg/kg de levamisol, bem como após 10 dias da alimentação com 900 e 1200 mg/kg. Similarmente, *Cirrhinus mrigala* alimentados com 150, 250 e 500 mg/kg de levamisol também mostrou aumento do burst respiratório e taxas de fagocitose (Bhatnagar & Lamba 2016). Porém, em *P. mesopotamicus*, alimentados durante 7 e 15 dias com 125-500 mg/kg de levamisol foi relatado redução no burst respiratório (Biller-Takahashi et al. 2016). Em *P. reticulatum*, alimentação com 50-500 mg/kg durante 30 dias não influenciou no burst respiratório dos peixes (Zanon et al. 2014). Todavia, a eficácia da imunomodulação do levamisol está relacionada ao período de tratamento, concentração usada, idade, status imune e espécie de peixe (Biller-Takahashi et al. 2016). Portanto, nossos resultados mostraram que 900 e 1200 mg/kg de levamisol pode ser administrado na dieta para promover efeito adjuvante na imunidade inata de *C. macropomum*.

Para concluir, o principal resultado deste estudo é que altas concentrações de ivermectina não são toleradas na dieta de *C. macropomum*, mas altas concentrações de levamisol são bem toleradas e trazem benefícios. Além disso, este primeiro estudo de alimentação com estes fármacos forneceu informações sobre a efetividade do levamisol no sistema imune inato dos peixes e esses dados podem ser importantes para futuros estudos envolvendo protocolos de alimentação para imunoestimulação e tratamentos antiparasitários de *C. macropomum*. Finalmente, futuros estudos devem se concentrar em avaliar os efeitos antiparasitários dessas concentrações de levamisol na dieta de *C. macropomum*.

Acknowledgments

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity research grant awarded to Dr. M. Tavares-Dias (# 303013/2015-0) and to project Acanto of Embrapa.

Ethical disclosures

This study was developed in accordance with the principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and authorization from Ethics Committee in the Use of Animal of the Embrapa Amazônia Ocidental (Protocol: N° 02/2017) was carried out.

LITERATURA CITADA

- Amiri Z, Bahrekazemi M (2017) Effect of oral administration of levamisole, quil-a and cinnamon in growth amount, hematological and immune parameters of Marmalade cichlid, *Labeotrophus fuelleborni* (Ahl, 1926). Iranian J Aqua Anim Health 3: 86-97.
- Athanassopoulou F, Ragias V, Roth M, Liberis N, Hatzinikolaou S (2002) Toxicity and pathological effects of orally and intraperitoneally administered ivermectin on sea bass *Dicentrarchus labrax*. Dis Aquat Org 52: 69-76
- Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Ann Rev Fish Dis 1:3–26
- Bhatnagar A, Lamba R (2016) Immunostimulating and growth promoting activity of dietary levamisole on *Cirrhinus mrigala* Fingerlings. J Aquac Mar Biol 4: 00102. doi: 10.15406/jamb.2016.04.00102.
- Biller-Takahashia JD, Montassierb HJ, Takahashia LS, Urbinati EC (2016) Levamisole promotes an adjuvant effect on the immunity of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) when immunized with *Aeromonas hydrophila*, even when provided in the diet. Anim Feed Sci Technol 211: 164–173.
- Collymore CV, Watral JR, White ME, Colvin S, Rasmussen R, Tolwani J, Kent ML (2014) Tolerance and efficacy of emamectin benzoate and ivermectin for the Treatment of *Pseudocapillaria tomentosa* in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). Zebrafish 11: 490–497
- FAO (2018). The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals. FAO, Rome.
- Johnson SC, Margolis L (1993) Efficacy of ivermectin for control of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* on Atlantic salmon. Dis Aquat Org 17: 101-105.
- Katharios P, Iliopoulou-Georgudaki J, Kapata-Zoumbos K, Spiropoulos S (2002) Toxicity of intraperitoneally injected ivermectin in sea bream, *Sparus aurata*. Fish Physiol Biochem. 25: 99–108.
- Khansari AR, Balasch JC, Reyes-López FE, Tort L (2017) Stressing the inflammatory network: immuno-endocrine responses to allostatic load in fish. J Marine Sci Res Tecnol 1:002.
- Mladineo I, Marsic-Lucic J, Buzancic M (2006) Toxicity and gross pathology of ivermectin bath treatment in sea bream *Sparus aurata* L. Ecotoxicol Environ Saf 63: 438–442.

- Li P, Wang X, Gatlin DM (2006) Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 251: 201–209
- Maqsood S, Samoon MH, Singh P (2009) Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish J Fish Aquat Sci* 9: 111-120.
- Misra CK, Das BK, Mukherjee SC (2009) Immune response, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings fed with levamisole supplemented diets for longer duration. *Aquac Nutrition* 15: 356-365.
- Morales-Serna FN, Chapa-López M, Martínez-Brown JM, Ibarra-Castro L, Medina-Guerrero RM, Fajer-Ávila EJ (2018) Efficacy of praziquantel and a combination anthelmintic (Aducto[®]) in bath treatments against *Tagia ecuadori* and *Neobenedenia melleni* (Monogenea), parasites of bullseye puffer fish. *Aquaculture* 492: 361–368
- Mulero V, Esteban MA, Muñoz J, Meseguer J (1998) Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 8: 49–62.
- Oliveira LCD, Majolo C, Brandão FR, Farias CFS, Oliveira MIB, Santos WB, Monteiro PC, Rocha MJS, Chagas EC, Tavares-Dias M (2019) Avermectins, praziquantel and levamisole have *in vitro* efficacy against *Neoechinorhynchus buttnerae* (Neoechinorhynchidae) in *Colossoma macropomum*, a Serrasalmidae from the Amazon. *J Fish Dis* (submitted).
- Pahor-Filho E, Júnior JP, Pilarski F, Urbinati EC (2017) Levamisole reduces parasitic infection in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 470: 123–128
- Palmer R, Coyne R, Davey S, Smith P (1996) Case notes on adverse reactions associated with ivermectin therapy of Atlantic salmon. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 17: 62-67.
- Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami MI (2013) Métodos para análise hematológica 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
- Sado RY, Bicudo AJA, Cyrino JEP (2010) Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). *J World Aquac Soc* 41: 66-75
- Sahoo PK, Kumari J, Mishra BK (2005) Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *J Appl Ichthyol* 21:151-155

- Shinn AP, Bron JE (2012) Considerations in the use of anti-parasitic drugs in aquaculture. In: Austin BA (ed). Infectious disease in aquaculture: prevention and control. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, p. 190-217.
- Siddiqui N (1977) Seasonal, size and comparative study of plasma proteins of four airbreathing freshwater fishes. Proc Indian Acad Sci. 85B: 384-390.
- Tavares-Dias M, Martins ML (2017) An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. J Paras Dis 41: 913-918
- Thiripurasundari M, Sathya K, Uma A, Srinivasan MR, Rajasekar P (2014) A comparative study on the toxicity of ivermectin in zebra fish and catla fish models. Indo Am J Pharm. Res 4: 3683-3688
- Ucán-Marín F, Ernst W, O'Dor RK, Sherry J (2012) Effects of food borne ivermectin on juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): survival, growth, behavior, and physiology. Aquaculture 334-337: 169–175
- Varó I, Rigos G, Navarro J C, Ramo J, Caldach-Giner J, Hernández A J, Pertusa A (2010) Torreblanca effect of ivermectin on the liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*: a proteomic approach. Chemosphere 80: 570–577
- Zanon RB, Cerozi BS, Cyrino JEP (2014) Dietary levamisole as immunostimulant for striped Surubim, *Pseudoplatystoma reticulatum*. J World Aquac Soc 45: 672-680.
- Zar JH (2010) Biostatistical analysis. 5th ed. Prentice Hall, New Jersey.

CONCLUSÕES FINAIS

- Houve ação antiparasitária *in vitro* de benzoato de emamectina (200 mg/L) e praziquantel (2500 e 2700 mg/L) contra *N. buttnerae* de *C. macropomum*.
- O uso dos benzimidazóis albendazol, febendazol e mebendazol e loperamida não são indicados para tratamentos antiparasitários contra *N. buttnerae* em *C. macropomum*, devido a ineficácia *in vitro*.
- O fármaco levamisol teve o melhor desempenho de todos os anti-helmínticos testados, pois 300, 350, 400 e 450 mg/L de levamisol tiveram excelente ação *in vitro* contra *N. buttnerae* e as concentrações 300 e 600 mg/kg teve boa tolerância quando adicionados na alimentação de *C. macropomum*.
- 4500 e 500 mg/L de ivermectina apresentaram ação anti-parasitária *in vitro* contra *N. buttnerae*, mas ocasionou morte de 100% dos *C. macropomum* em 10 horas de alimentação.
- Como houve ação antiparasitária *in vitro* de benzoato de emamectina e praziquantel contra *N. buttnerae*, é necessário testar a toxicidade desses antiparasitários em dietas para *C. macropomum*.

Anexo

**Artigo aceito no Journal of Fish Diseases
e no Diseases of Aquatic Organisms**

Avermectins, praziquantel and levamisole have in vitro efficacy against *Neoechinorhynchus buttnerae* (Neoechinorhynchidae) in *Colossoma macropomum*: A Serrasalminidae from the Amazon

Lígia C. D. Oliveira¹ | Cláudia Majolo² | Franmir R. Brandão³ | Caio Francisco S. Farias⁴ | Maria Inês B. Oliveira³ | Welliton B. Santos⁵ | Patrícia C. Monteiro³ | Maria Juliete S. Rocha³ | Edsandra C. Chagas^{2,3} | Marcos Tavares-Dias^{1,6} 

¹Postgraduate Program on Tropical Biodiversity (PPGBio), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, Brazil

²Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brazil

³Postgraduate Program on Fishery Sciences in the Tropics, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil

⁴Uninorte Laureate International Universities, Manaus, Brazil

⁵Universidade Nilton Lins, Manaus, Brazil

⁶Embrapa Amapá, Macapá, Brazil

Correspondence

Marcos Tavares-Dias, Embrapa Amapá, Macapá, Brazil.

Email: marcos.tavares@embrapa.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 303013/2015-0

KEYWORDS: acanthocephalan, anthelmintics, infection, treatment

1 | INTRODUCTION

Neoechinorhynchus buttnerae Golvan, 1956 is an acanthocephalan of the family Neoechinorhynchidae for which the ostracod *Cypridopsis vidua* (Müller, 1776) Brady, 1867 is the intermediate host (Lourenço, Morey, Pereira, & Malta, 2018). This endoparasite causes great problems in aquaculture production of *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Brazilian Amazon, where it infects 100% of the fish (Jerônimo et al., 2017; Lourenço, Morey, Pereira, & Malta, 2017; Matos, Oliveira, Gomes, & Silva, 2017), affecting the intestinal tissue of hosts and causing impairments of nutrient uptake (Matos et al., 2017) and leading to great economic losses of 100% of production (Silva-Gomes et al., 2017). However, this helminth endoparasite has been often neglected as causative agents of *C. macropomum* diseases. Therefore, as this acanthocephalan may have detrimental consequences for health of this farmed fish (Jerônimo et al., 2017; Lourenço et al., 2017; Matos et al., 2017), it is important to implement strategies to control them.

Anthelmintic drugs such as avermectins (ivermectin and emamectin benzoate) and benzimidazoles (albendazole, mebendazole and fenbendazole) have been used to treat parasitic infections by

monogeneans, nematodes, digeneans and cestodes in different fish species (Collymore et al., 2014; Hardy-Smith et al., 2012; Shinn & Bron, 2012). Despite continuing need to expand the use of strategies for integrated management of parasite control among farmed fish (Shinn & Bron, 2012), treatment with anthelmintic drugs is a tool that has been little tested for controlling infections by acanthocephalan species. Levamisole, loperamide and praziquantel have been recommended for in vitro control of the acanthocephalans *Neoechinorhynchus rutili* Müller, 1780 and *Echinorhynchus truttae* Schrank, 1788 in *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 (Taraschewski, Mehlhorn, & Raether, 1990). Praziquantel has also shown potential as an oral treatment against the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* Müller, 1776 in *Barbus barbus* Linnaeus, 1758 (Zuskova et al., 2018). The number of antiparasitic drugs that are efficacious, consistent and safe and which can be used across a wide range of environmental conditions is very limited. Since no other suitable chemotherapeutic treatments for acanthocephalan infections in fish are available, the aim of this study was to investigate the efficacy, in vitro, of albendazole, levamisole, fenbendazole, mebendazole, praziquantel, ivermectin, loperamide and emamectin benzoate against *N. buttnerae* in *C. macropomum*.

Toxicological, hematological and immunological effects of levamisole and ivermectin diet supplementation on *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae)

Lígia Carvalho Dias Oliveira¹, Alexandre Renato Pinto Brasiliense¹,
Márcia Kelly Reis Dias¹, Eliane Tie Oba Yoshioka², Marcos Tavares-Dias^{1,2,*}

¹Postgraduate Program on Tropical Biodiversity (PPGBio), Federal University of Amapá (UNIFAP),
Rodovia Juscelino Kubitschek S/N, Universidade, 68903-419 Macapá, AP, Brazil

²Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 5, 2600, Universidade, 68903-419 Macapá, AP, Brazil

ABSTRACT: This study investigated the toxicological, hematological and immunological effects of diets supplemented with levamisole and ivermectin on *Colossoma macropomum*. Fish were fed for 24, 96 and 240 h with diets containing 300, 600, 900 and 1200 mg of levamisole kg⁻¹ of feed. None of the levamisole concentrations caused either mortality or behavioral alterations among the fish over 10 d of feeding. In comparison, a single feeding of ivermectin at 4500, 9000, 13 500 or 18 000 mg kg⁻¹ caused 100% mortality among the fish within 10 h. There were no alterations in erythrocyte parameters or albumin in any treatments with levamisole after 24, 96 and 240 h of feeding. At concentrations of 900 and 1200 mg kg⁻¹, levamisole caused decreases in the albumin-to-globulin ratio compared to the control group and the 300 and 600 mg kg⁻¹ diet treatment groups. Levels of glucose and total plasma protein were higher in the fish fed with 600, 900 and 1200 mg kg⁻¹ than in the controls and the 300 mg kg⁻¹ diet treatment group. After 10 d of receiving feed supplemented with levamisole, globulin levels were higher in the 600 mg kg⁻¹ group than in the controls. Respiratory burst activity of leukocytes also increased in the fish supplemented with the 900 and 1200 mg kg⁻¹ diets compared to the controls and other treatments. This is the first study to investigate how diets supplemented with these drugs affect *C. macropomum*. Our research indicates that all the levamisole concentrations tested can be used in the diet of *C. macropomum* for antiparasitic treatments against helminth species, and that dietary treatments with levamisole can stimulate components of the innate immune system.

KEY WORDS: Anthelmintics · Diet · Hematological parameters · Tambaqui · Tolerance

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

1. INTRODUCTION

The expansion of the fish farming industry has led to an increase in parasitosis because of numerous stressors (e.g. low water quality, high density, handling, reproduction and transportation, among others) that negatively affect the health of the fish (Tavares-Dias & Martins 2017, Pahor-Filho et al. 2017). Dis-

eases are a major concern for fish farming worldwide; global economic losses associated with diseases have been estimated to be US \$1.05–9.58 billion yr⁻¹ (Shinn & Bron 2012). Therefore, there is growing interest not only in understanding diseases, but also in finding low-cost, effective drugs that can be administered in the diet of fish to control and treat parasitosis caused by helminth species.

*Corresponding author: marcos.tavares@embrapa.br