

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

## **VITAMINA A EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO**

IGO GOMES GUIMARÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Zootecnia como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em Zootecnia, Área  
de Concentração em Nutrição e Produção Animal.

BOTUCATU - SP

Março – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

## **VITAMINA A EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO**

IGO GOMES GUIMARÃES

Zootecnista

ORIENTADORA: Prof. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Zootecnia como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em Zootecnia, Área  
de Concentração em Nutrição e Produção Animal.

BOTUCATU - SP

Março – 2009

**A DEUS, pela existência, saúde e dom da sabedoria;**

**Aos meus pais, Naiza e Nivaldo, e irmãos, pelo amor, oportunidade, compreensão, incentivo e exemplo de perseverança que de modos diversos me auxiliaram a realizar mais este sonho;**

**Aos meus avós (*in memoriam*) pelo exemplo de força e batalha às intempéries da vida;**

**A Margarida Maria Barros, mestra e amiga, pela confiança a mim reservada e incentivo nos momentos mais difíceis.**

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Botucatu que comportou todos os meus anseios durante esses anos de curso e à todos os docentes que contribuíram de forma positiva para minha formação;

À professora e amiga Dra. Margarida Maria Barros, pela orientação, exemplo de ser humano e profissional;

Ao Dr. Chhorn Lim, pela orientação nos Estados Unidos, exemplo de ser humano a quem dedico o último capítulo dessa tese e meu crescimento pessoal e profissional deste último ano;

Ao professor Dr. Luiz Edivaldo Pezzato pelo apoio, paciência nos ensinamentos e amizade;

Ao professor Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, pela co-orientação, amizade e auxílio nas análises imunológicas;

Aos funcionários do Pós-graduação Seila Cristina Cassineli Vieira e Danilo Juarez Teodoro Dias, pela amizade, auxílio nos trâmites burocráticos e compreensão;

Ao professor Dr. Ary Fernandes Junior, e estudantes, técnicos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu pelo auxílio das análises microbiológicas e imunológicas;

À Dra. Mediha Yildirim-Aksoy, pela amizade e ensinamentos microbiológicos e imunológicos a mim reservados durante estada nos EUA;

À M.Sc. Rashida Eljack pelo auxílio e companheirismo na condução do experimento nos EUA;

À Valéria Louro Ribeiro pela amizade, compreensão e coleguismo que, apesar da distância, não deixou extinguir a chama de nossa amizade;

Aos colegas de trabalho Caroline Pelegrina, Vivian Gomes dos Santos, Rosângela do Nascimento Fernandes, Dario Rocha Falcon, Ademir Calvo Fernandes Júnior, André Moreira Bordinhon e Fernando Kojima Nakagome pela amizade, ensinamentos e auxílio na condução deste trabalho;

À aluna de graduação Graciela Pessoa Martins pela amizade e auxílio na condução desta pesquisa;

À Ana Paula Lima pela longa e prazerosa amizade que me dedica até hoje;

Aos meus amigos de pós-graduação Luciana Rodrigues, Claudia Marie Komyiama, Sabrina Endo Takahashi, pela amizade e coleguismo;

À toda minha família e amigos que torcem, oram e vibram a cada passo que dou em minha vida;

Às funcionárias da Biblioteca, Denise, Cida e Solange, pelo auxílio, disposição e meiguice nas horas de estudo;

À Edma Carvalho de Miranda pelos grandes ensinamentos proporcionados e principalmente à constituição do meu caráter profissional;

Ao meu amigo, em especial, Roberto da Silva Camargo pelo apoio, amizade e dedicação;

A Dra. Fabiana Pilarsk por ceder a bactéria utilizada na condução dos experimentos;

À toda equipe do Aquatic Animal Health Research Laboratory, pelo companheirismo, auxílio, compreensão, ensinamentos e oportunidade durante minha estada nos EUA;

Aos funcionários do Laboratório de Bromatologia, Renato e Elaine, pela colaboração na realização das análises químico-bromatológicas;

À todas as pessoas que auxiliaram de alguma forma na realização deste sonho e deste trabalho e que passaram por minha vida rapidamente porém deixando sua marca em minha história.

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| <b>CAPÍTULO - 1</b> .....  | 1      |
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....  | 2      |
| Referências Bibliográficas.....  | 10     |
| <br>   |        |
| <b>CAPÍTULO - 2</b> .....  | 14     |
| DESEMPENHO PRODUTIVO DE ALEVINOS TILÁPIAS DO NILO<br>ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE VITAMINA<br>A.....   | 15     |
| Resumo.....  | 15     |
| Abstract.....  | 16     |
| Introdução.....  | 17     |
| Material e Métodos.....  | 18     |
| Resultados .....   | 20     |
| Discussão.....   | 21     |
| Referências Bibliográficas.....  | 24     |
| Tabela 1. Composição percentual da dieta basal.....  | 27     |
| Tabela 2. Ganho de peso médio (GPM), consumo diário de ração (CDR), conversão<br>alimentar aparente (CAA), sobrevivência (SBV), taxa de crescimento específico<br>(TCE), taxa de eficiência protéica (TEP) e taxa de retenção protéica (TRP) de tilápias<br>do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A..... | 28     |
| Figura 1. Ganho de peso médio de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo<br>níveis crescentes de vitamina A.....  | 29     |
| Figura 2. Consumo diário de ração de tilápias do Nilo alimentadas com dietas<br>contendo níveis crescentes de vitamina A.....  | 29     |
| Figura 3. Taxa de sobrevivência de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo<br>níveis crescentes de vitamina A.....  | 30     |
| Figura 4. Taxa de crescimento específico de tilápias do Nilo alimentadas com dietas<br>contendo níveis crescentes de vitamina A.....   | 30     |

|  |    |
|--|----|
| Figura 5. Taxa de retenção protéica de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis de vitamina A.....  | 31 |
| <b>CAPÍTULO – 3</b> .....  | 32 |
| PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E PERFIL HEMATOLÓGICO DE TILÁPIAS DO NILO ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE VITAMINA A E SUBMETIDAS À ESTÍMULO PELO FRIO E DESAFIADAS COM <i>Aeromonas hydrophila</i> .....   | 33 |
| Resumo.....  | 33 |
| Abstract.....  | 34 |
| Introdução.....  | 35 |
| Material e Métodos.....  | 36 |
| Resultados.....  | 41 |
| Discussão.....   | 44 |
| Referências Bibliográficas.....  | 51 |
| Tabela 1. Composição percentual e proximal da dieta basal.....   | 55 |
| Tabela 2. Perfil hematológico de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A e expostas à estímulo pelo frio.....   | 56 |
| Tabela 3. Leucograma de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A e expostas à estímulo pelo frio.....  | 57 |
| Tabela 4. Proteína plasmática total (PPT), globulinas, albumina (ALB) e relação albumina:globulina (A:G) de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A e submetidas a estímulo pelo frio.....                                      | 58 |
| Tabela 5. Produção de espécies reativas de oxigênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e NO) por monócitos de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A e submetidas à estímulo pelo frio e desafiadas com <i>A. hydrophila</i> ..... | 59 |
| Tabela 6. Número médio de dias para a primeira mortalidade e mortalidade cumulativa de tilápias do Nilo após 15 dias de desafio com <i>A. hydrophila</i> .....   | 60 |

#### **CAPÍTULO – 4**

|  |    |
|--|----|
| EFEITO DE MEGADOSES DE VITAMINA A NO DESEMPENHO, RESPOSTA IMUNE E RESISTÊNCIA À INFECÇÃO COM <i>Streptococcus iniae</i> .....  | 62 |
| Resumo.....  | 62 |
| Abstract.....  | 63 |
| Introdução.....  | 64 |
| Material e métodos.....  | 65 |
| Resultados.....  | 71 |
| Discussão.....   | 73 |
| Referências Bibliográficas.....  | 79 |
| Tabela 1. Composição percentual e proximal da dieta basal.....   | 83 |
| Tabela 2. Desempenho produtivo de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas contendo diferentes níveis de vitamina A durante 10 semanas.....   | 84 |
| Tabela 3. Valores médios ( $\pm$ SD) para número de eritrócitos, número de leucócitos, taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas contendo diferentes níveis de vitamina A.....   | 85 |
| Tabela 4. Volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e fragilidade eritrocitária (FE) de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas contendo diferentes níveis de vitamina A.....  | 86 |
| Tabela 5. Valores médios ( $\pm$ SD) para produção de ânion superóxido, proteína sérica, imunoglobulina sérica (Ig), atividade da via alternativa do complemento (SH <sub>50</sub> ) e atividade da lisozima no soro de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas contendo diferentes níveis de vitamina A durante 10 semanas..... | 87 |
| Tabela 6. Conteúdo de vitamina A das dietas e do fígado, e índice hepatossomático (IHS) de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de vitamina A durante 10 semanas.....  | 87 |
| Tabela 7. Número médio de dias para a primeira mortalidade, mortalidade cumulativa e título de anticorpo de tilápias do Nilo após 21 dias de desafio com <i>Streptococcus iniae</i> .....  | 88 |
| <b>IMPLICAÇÕES</b> .....   | 89 |



# **CAPÍTULO - 1**

## 1. Considerações Iniciais

As vitaminas constituem um grupo complexo de compostos orgânicos que se apresentam em pequenas quantidades nos alimentos sendo essenciais para o equilíbrio orgânico animal, causando sinais de deficiência quando em quantidades insuficientes. São necessárias em pequenas quantidades na dieta para manutenção da saúde, crescimento e reprodução normal do organismo, funcionando principalmente como coenzimas (McDowell, 1989). Desempenham papel vital no metabolismo, estando envolvidas em quase todas as reações e vias bioquímicas conhecidas (Devlin, 2002).

As vitaminas são divididas em duas classes básicas, as lipossolúveis e hidrossolúveis, ou seja, solúveis em solventes orgânicos como as vitaminas A, D, K e E, e as solúveis em água como as vitaminas do complexo B e vitamina C, respectivamente.

A vitamina A desempenha várias funções no organismo estando envolvida tanto na síntese de algumas glicoproteínas e glicosaminoglicanos agindo como hormônios esteróides na regulação do crescimento e na diferenciação celular, assim como na manutenção normal dos processos visuais (Devlin, 2002). Desta forma, Sherman (1986) resume que as principais funções da vitamina A estão relacionadas à diferenciação celular, crescimento dos tecidos e visão.

Para desempenhar suas funções normais no organismo, a vitamina A pode ser convertida em três principais compostos que possuem ação de vitamina A. Estas formas ativas de vitamina A são o retinol, retinal (retinaldeído) e ácido retinóico (Figura 1). Estas substâncias são sintetizadas pelas plantas numa forma mais complexa, os carotenóides, que por sua vez são clivados à retinol pela maioria dos animais e armazenados no fígado como palmitato de retinol (Devlin, 2002). Existem duas vias propostas para a clivagem oxidativa de carotenóides em vitamina A: a via intrínseca e a extrínseca. A primeira é baseada na produção direta de retinal a partir do  $\beta$ -caroteno pela ação da 15,15'- $\beta$ -caroteno dioxigenase; enquanto na via extrínseca há a clivagem química não-enzimática de carotenóides a carotenal.

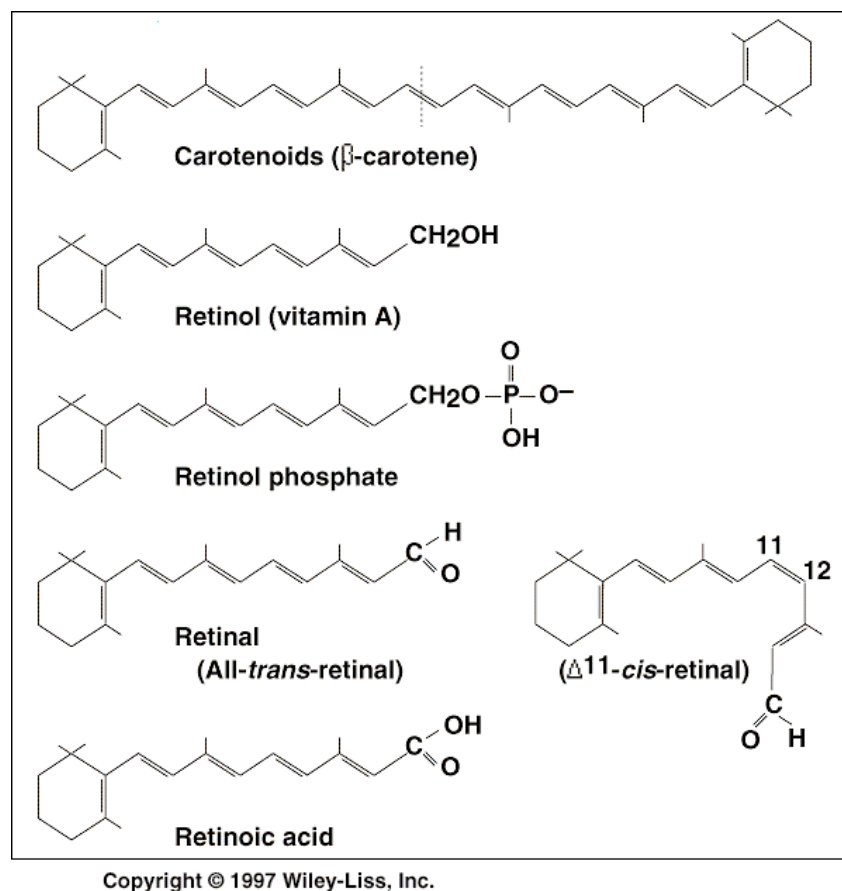


Figura 1. Forma estrutural de compostos com atividade de vitamina A (Devlin, 2002)

Os mecanismos envolvidos na digestão e absorção da vitamina A necessitam da participação de várias enzimas. Assim, ésteres de retinil presentes nos ingredientes de origem animal são hidrolisados no intestino tanto pela ação da enzima pancreática, lipase do triacilglicerol, como pela enzima da borda em escova intestinal, fosfolipase B. O retinol formado entra no enterócito e liga-se a proteína transportadora de retinol tipo 2. Este complexo serve como substrato para reesterificação do retinol pela enzima lecitina-retinol aciltransferase (LRAT). Então, os ésteres de retinol são incorporados ao quilomícron e secretados para a linfa. Parte do retinol não esterificado é absorvido via sangue portal, saindo da via quilomícron-linfática (Harrison, 2005).

As moléculas de retinol formadas a partir dos carotenóides seguem passos distintos. O retinal formado a partir dos carotenóides é reduzido dentro dos enterócitos à retinol pela enzima álcool desidrogenase e então reesterificados, seguindo a última parte da via dos ésteres de retinila (Devlin, 2002).

Os quilomícrons contendo ésteres de retinila são transportados através do sistema linfático até o fígado, onde aproximadamente 75% dos produtos derivados do retinol são armazenados. No fígado, o processamento da vitamina A ocorre primariamente nas células estreladas hepáticas, onde a vitamina é armazenada como ésteres de retinila, estes compostos passam diretamente para as células parênquimatosas adjacentes por meio de uma proteína transportadora de retinol, ou é oxidada (Kaneko, 1997). O fígado é o principal local de armazenamento da vitamina A, podendo também ser encontrada em quantidades consideráveis no olho, tecido adiposo e plasma sanguíneo.

Quando a vitamina A é necessária em algum tecido do corpo, os ésteres de retinila armazenados no fígado são hidrolisados e liberados como retinol ligado a uma proteína transportadora de retinol (retinol-RBP) para a corrente sanguínea (Kaneko, 1997). A proteína transportadora de retinol (RBP) plasmática é o principal transportador de todo-*trans*-retinol, o qual constituiu, tipicamente, mais de 90% da vitamina A plasmática (Ross, 2003).

Dentro das células dos tecidos-alvo, a vitamina A, como retinol, interage com proteínas ligantes celulares que possuem a função de controlar o metabolismo subsequente, por exemplo, a oxidação em retinal e ácido retinóico. Algumas destas proteínas possuem função no mecanismo de transcrição e regulação, o que faz da vitamina A um nutriente muito importante nos vários mecanismos de regulação celular (Kaneko, 1997).

Na Figura 2 está apresentado o esquema geral do metabolismo da vitamina A em mamíferos.

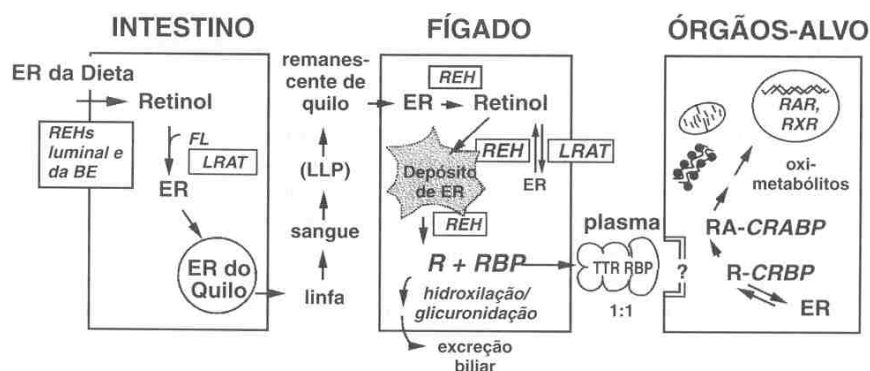


Figura 2. Esquema geral do metabolismo da vitamina A (Ross, 2003)

Os animais necessitam de contínuo suprimento de nutrientes para atender suas exigências nutricionais, de forma que possam expressar todo seu potencial zootécnico e se manterem saudáveis frente aos fatores estressores a que são submetidos durante o processo produtivo. Tendo em vista este aspecto, estudos com peixes têm se fixado na determinação das exigências nutricionais de vitamina A para as diversas espécies. A exigência deste nutriente para a maioria das espécies de peixe está entre 1.000 e 8.000 UI/kg de ração (Kitamura et al., 1967; Halver, 1989; NRC, 1993).

Mohamed et al. (2003) avaliaram a exigência de vitamina A para juvenis de “greasy grouper” (*Epinephelus tauvina*) e concluíram que a quantidade mínima para o máximo crescimento foi de 3.101 UI de vitamina A/kg da dieta com concentração plasmática de vitamina A de 179 µg/mL.

No sentido de avaliar os efeitos de diferentes concentrações de vitamina A e β-caroteno no desempenho de juvenis de tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) Hu et al. (2005) observaram que a concentração de 5.850 a 6.970 UI de vitamina A/kg da dieta foram as quantidades mínimas para maior ganho em peso e retenção hepática. Este valor é similar aos observados por Bacconi (2003) trabalhando com a tilápia do Nilo, que estimou a exigência de vitamina A sendo de 5.400 UI de vitamina A/kg da dieta. Apesar da maioria dos estudos apresentarem a exigência de vitamina A entre 1.000 e 8.000 UI/kg da dieta, Hernandez et al. (2005) obtiveram maior ganho em peso quando alimentaram juvenis de “Japanese flounder” (*Paralichthys olivaceus*) com dieta contendo 9.000 UI de vitamina A/kg de ração.

Normalmente, os trabalhos de exigência são baseados na resposta de ganho em peso dos peixes frente a níveis crescentes do nutriente em estudo. Entretanto, a avaliação única destes parâmetros de desempenho traz respostas pouco eficientes quando o animal é submetido a fatores estressores, indicando deficiência marginal do nutriente em questão. Desta forma, Blazer (1992) ressaltou que as exigências nutricionais para rápido crescimento nem sempre são aquelas que necessariamente promoverão maior resistência a doenças ou fortalecimento do sistema imunológico.

O estado nutricional é considerado um dos fatores mais importantes que determinam a capacidade do peixe em resistir a doenças. Desta forma, pesquisas objetivando a nutrição e o fortalecimento da resposta imune imune de peixes têm se

expandido com a finalidade de definir a função de nutrientes específicos na resistência a doenças (Lall, 2000).

O sistema imune dos peixes, assim como de outras espécies animais, é amplamente dividido em imunidade adquirida ou específica e imunidade inata ou não específica. Ambos os sistemas utilizam mecanismos celulares e humorais para realizar a proteção do organismo contra infecção. O sistema imune específico é ativado a partir da interação inicial entre um ou mais antígenos e os linfócitos, resultando em produção inicial de anticorpos contra o antígeno e o desenvolvimento de memória imunológica. A memória imunológica capacita o organismo a rápida produção de anticorpos quando exposto novamente ao mesmo antígeno. O sistema imune não específico inclui os sistemas gerais de defesa do hospedeiro como, barreiras físicas (pele e muco), enzimas (lactoperoxidase na saliva, lisozima no muco e outras secreções no suco gástrico e tecidos), células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) e proteínas plasmáticas (interferon, proteína reativa ao carbono, complemento entre outros) (Lall, 2000).

A ligação entre deficiência clínica de vitamina A e a morbidade e mortalidade frente a doenças infecciosas foi reconhecida desde o início do século 20 a partir dos trabalhos de Wolbach & Howe (1925), Green & Mellanby (1928) e Lassen (1930). Além das funções dessa vitamina na manutenção dos processos visuais e, na regulação do crescimento e diferenciação celular, a mesma está associada, ainda, com a integridade do sistema imune e com a regulação dos mecanismos de defesa contra patógenos. Segundo Stephensen (2001) a sua deficiência prejudica a imunidade inata pelo impedimento da regeneração normal da barreira mucosa danificada pela infecção, e pela redução da atividade de neutrófilos, macrófagos e células “natural killers” (NK). Este autor salienta ainda que a vitamina A é necessária para a função normal do sistema imune adquirido possuindo papel fundamental no desenvolvimento de ambas as células T auxiliares e células B.

Os efeitos da vitamina A sobre a atividade imunológica de mamíferos e aves têm sido vastamente estudada, principalmente no tocante as deficiências marginais a que estes animais estão submetidos e ao tipo de dieta de uma determinada população, no caso de humanos. Desta forma, Wiedermann et al. (1996) avaliaram o efeito da deficiência de vitamina A na resposta aos processos inflamatórios em ratos. Estes

autores concluíram que a deficiência de vitamina A agravou as manifestações clínicas das reações inflamatórias e que esta pode levar ao risco de dano tecidual irreversível.

Bruns & Webb Jr. (1990) conduzindo experimento com cordeiros investigaram a relação entre o estado nutricional de vitamina A e a função imune. Estes autores concluíram que a deficiência severa desta vitamina está associada com alterações na função imune, entretanto estas mudanças não parecem ser mediadas pelas concentrações de cortisol no soro.

Segundo Stephensen (2001) tanto a deficiência de vitamina A como alguns tipos de infecções podem determinar supressão do sistema imunológico. Este autor salienta que a deficiência desta vitamina prejudica tanto a resposta imune inata como a adaptativa à infecção, e que em casos de indivíduos com deficiência marginal expostos à infecção, tanto a resposta imune quanto o estado nutricional de vitamina A podem ser afetados pela redução no consumo e na absorção, e aumento da excreção desta vitamina.

Hagen et al. (1999) explicaram que a influência dos compostos com ação de vitamina A sobre células como monócitos e macrófagos na imunidade inata está relacionada com o efeito regulador desta vitamina sobre a diferenciação de monócitos em macrófagos assim como sobre a atividade dos macrófagos diferenciados. Apesar da grande importância desta vitamina no metabolismo animal, pouco se sabe sobre seus processos metabólicos nos peixes e seu efeito imunomodulador, como tem sido descrito pela literatura para humanos e demais espécies.

Poucos têm sido os estudos relativos aos efeitos da vitamina A sobre o sistema imunológico e a resistência à doenças em peixes. Entretanto, alguns autores têm reportado efeitos imunomodulatórios de compostos com ação provitamina A, como os carotenóides, em peixes. De acordo com Lim et al. (2005) os carotenóides podem aumentar as reações de defesa biológica, incluindo a atividade dos linfócitos, a produção de várias citocinas e a atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos em peixes.

Neste sentido Amar et al. (2001), em estudo com a truta arco-íris, avaliaram a influência de vários carotenóides sintéticos sobre os mecanismos de biodefesa. Estes autores concluíram que entre os carotenóides utilizados (cataxantina, astaxantina e  $\beta$ -caroteno) o  $\beta$ -caroteno e a astaxantina elevaram os fatores humorais como as proteínas do complemento e a atividade da lisozima, assim como os fatores celulares (fagocitose e

citotoxicidade inespecífica). Os autores observaram, ainda, que na presença das vitaminas A, C e E, os carotenóides exerceram maior influência nos mecanismos de biodefesa.

Em estudo conduzido com a truta arco-íris no sentido de avaliar o efeito do  $\beta$ -caroteno sobre a resposta imune, Amar et al. (2000) observaram aumento na resposta imune (atividade do complemento e imunoglobulinas totais do plasma) quando alimentadas com dieta contendo 200 mg de  $\beta$ -caroteno/kg da dieta. Entretanto, estes autores não constataram influência bem definida para as outras respostas imunológicas como atividade da lisozima, atividade fagocítica e “burst” respiratório.

Entretanto, Thompson et al. (1995) observaram pequeno efeito imunomodulador da suplementação de vitamina A (18 mg/kg da dieta) e/ou astaxantina (100 mg/kg da dieta) em dietas práticas para a truta arco-íris. Da mesma forma, Thompson et al. (1994) observaram pequeno efeito imunomodulador em salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) alimentados com dietas suplementadas com vitamina A e infectados com *Aeromonas salmonicida*. Estes autores observaram ainda que a deficiência de vitamina A provocou redução na migração de leucócitos e na atividade bactericida do soro.

Os efeitos da vitamina A sobre os parâmetros hematológicos têm sido descritos. Assim, McLaren et al. (1965) explica que a natureza metabólica desta função da vitamina A ainda não está bem clara, entretanto indícios sugerem que a deficiência desta vitamina resulta em prejudicada reutilização dos estoques de ferro no baço e ossos para eritropoiese. Desta forma, Strube et al. (2002) avaliaram o efeito da deficiência marginal de vitamina A e de ferro sobre os índices hematológicos e na regulação do metabolismo do ferro em ratos. Estes autores observaram que a deficiência de ferro esteve associada com a menor concentração de retinol plasmático e elevadas concentrações hepáticas de retinol, indicando que a deficiência severa de ferro pode levar a menor utilização dos estoques corpóreos de vitamina A.

Alguns estudos com ratos têm demonstrado os efeitos da vitamina A sobre os parâmetros hematológicos como porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina (Beynen et al., 1991; Roodenburg et al., 1994; Roodenburg et al., 1996). Desta forma, Strube et al. (2002) lançaram a hipótese de que a deficiência de vitamina A promove o seqüestro do ferro nos tecidos, tornando-o indisponível para a eritropoiese, resultando em anemia e índices plasmáticos de ferro anormais.



Com base no exposto, o estudo propõe avaliar o efeito da vitamina A sobre os parâmetros bioquímicos que indicam a saúde do animal, tanto em condições normais como quando submetidos a agentes estressores, assim como sua influência sobre o desempenho produtivo da tilápia do Nilo.

Desta forma, apresentam-se três pesquisas que se encontram nos capítulos 2, 3 e 4, realizadas com o objetivo de determinar os efeitos fisiológicos da vitamina A no desempenho e saúde da tilápia do Nilo. A primeira pesquisa apresenta a exigência em vitamina A para o desempenho utilizando dietas práticas. A segunda avaliou o efeito de níveis de vitamina A sobre a resistência a dois tipos de agentes estressores e o efeito fisiológico de níveis crescentes desta vitamina, enquanto a terceira pesquisa avaliou o efeito da ausência, subdosagem e megadoses de vitamina A sobre o desempenho e higidez da tilápia do Nilo.

O Capítulo - 2, intitulado “**Desempenho produtivo de alevinos de tilápias do Nilo alimentadas com níveis crescentes de vitamina A**” se apresenta de acordo com as normas para publicação da revista *Aquaculture Nutrition*. Esta pesquisa teve por objetivo específico avaliar a exigência de vitamina A para tilápia do Nilo utilizando dietas práticas extrusadas.

O Capítulo - 3, intitulado “**Parâmetros imunológicos e perfil hematológico de tilápias do Nilo alimentadas com níveis crescentes de vitamina A e submetidas à estímulo pelo frio e desafiadas com *Aeromonas hydrophila***”, está de acordo com as normas para publicação na revista *Aquaculture*. O objetivo específico desta pesquisa foi determinar os efeitos fisiológicos de níveis crescentes de vitamina A para tilápia do Nilo em diferentes condições de estresse.

O Capítulo - 4, intitulado “**Ausência e suplementação de vitamina A no desempenho, resposta imune e resistência à infecção por *Streptococcus iniae***”, está de acordo com as normas para publicação na revista *Aquaculture*. O objetivo específico desta pesquisa foi avaliar os efeitos sobre o sistema imune da administração dietética de níveis de vitamina A acima da exigência recomendada para a tilápia do Nilo.

## Referências Bibliográficas

- AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH, S.; OKAMOTO, N.; WATANABE, T. Effect of  $\beta$ -carotene on the immune response of rainbow trout. *Fisheries Science*, v. 66, p. 1068-1075, 2000.
- AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, v. 32 (sup. 1), p. 162-173, 2001.
- BACCONI, D.F. Exigência nutricional de vitamina A para alevinos de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. Piracicaba, 31p., 2003. **Dissertação**.
- BEYNEN, A. C.; SIJATSMA, K. W.; VAN DEN BERG, G. J.; LAMMENS, A. G.; WEST, C. E. Iron metabolism in vitamin A deficiency. In: *Trace elements in man and animals-7*, IMI, Zagreb, Yugoslavia 1991.
- BLAZER, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Disease* 1, p. 309-323.
- BRUNS, N.J. & WEBB JR, K.E. Vitamin A deficiency: serum cortisol and humoral immunity in lambs. *Journal of Animal Science*, v. 68, p. 454-459, 1990.
- DEVLIN, T. M. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. Ed. Edgard Blücher. São Paulo-SP, 1998. 1007p.
- GREEN, H.N. & MELLANBY, E. Vitamin A as an anti-infective agent. *Br. Med. Journal*, v. 2, p. 691-696, 1928.
- HAGEN, E.; MYHRE, A.M.; SMELAND, S.; HALVORSEN, B.; NORUM, K.R.; BLONHOFF, R. Uptake of vitamin A in macrophages from physiologic transport proteins: role of retinol-binding protein and chylomicron remnants. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 10, p. 345-352, 1999.
- HALVER, J.E. The vitamins. In: *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, EUA, p. 32-102, 1989.
- HARRISON, E.H. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annual Review of Nutrition*, v. 25, p. 87-103, 2005.

- HERNANDEZ, L.H.H.; TESHIMA, S.-I.; ISHIKAWA, M.; ALAM, S.; KOSHIO, S.; TANAKA, Y. Dietary vitamin A requirements of juvenile japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, v. 11, p. 03-09, 2005.
- HU, C.-J.; CHEN, S.-M.; PAN, C.-H.; HUANG, C.-H. Effects of dietary vitamin A or  $\beta$ -carotene concentrations on growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Article In Press. Aquaculture*, 2005.
- KANEKO, J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press, San Diego, California, EUA, 1997. 932 p.
- KITAMURA, S.; SUWA, T.; OHARA, S.; NAKAGAWA, K. Studies on vitamin requirements of rainbow trout-III. Requirements of vitamin A and deficiency symptoms. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, v. 33, p. 1126-1131, 1967.
- LALL, S.P. Nutrition and health of fish. In: Avances em nutrição acuícola V. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 19-22 de noviembre. Mérida, Yucatán, México, 2000.
- LASSEN, H.C.A. Vitamin A deficiency and resistance against a specific infection. A preliminary report. *Journal of Hygiene*, v. 30, p. 300-310, 1930.
- LIM, C; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESZIUS, P.H. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: *1º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes*, Botucatu, p. 46-83, 2005.
- MCDOWELL, L.R. *Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition*. Academic Press Inc., California, 1989. 486p.
- MCLAREN, D.S., TCHALIAN, M., AJANS, Z.A. Biochemical and hematologic changes in the vitamin A-deficient rat. *American journal of Clinical Nutrition*, v. 17, p. 131-138, 1965.
- MOHAMED, J.S.; SIVARAM, V.; CHRISTOPHER, R.; MARIAN, M.P.; MURUGARDASS, S.; HUSSAIN, M.R. Dietary vitamin A requirement of juvenile greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). *Aquaculture*, v. 219, p. 693-701, 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NAS-NRC. *Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestics animals*. Washington, 1993. 102p.

- ROODENBURG, A.J.; WEST, C.E.; YU, S.; BEYNEN, A.C. Comparison between time-dependent changes in iron metabolism of rats as induced by marginal deficiency of either vitamin A or iron. *British Journal of Nutrition*, v. 71, p. 687-699, 1994.
- ROODENBURG, A.J.C.; WEST, C.E.; HOVENIER, R.; BEYNEN, A.C. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *British Journal of Nutrition*, v. 75, p. 623-636, 1996.
- ROSS, A.C. Vitamina A e retinóides. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. (Eds.), *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. Manole, Barueri, São Paulo, Brasil, 2003.1026p.
- SHERMAN, M.I. *Retinoid and cell differentiation*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.
- STEPHENSEN, C.B. Vitamin A, infection, and immune function. *Annual Review of Nutrition*, v. 21, p. 167-192, 2001.
- STRUBE, Y. N. J.; BEARD, J. L.; ROSS, A. C. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *Journal of Nutrition*, v. 132, p. 3607-3615, 2002..
- THOMPSON, I.; CHOUBERT, G.; HOULIHAN, D.F.; SECOMBES, C.J. The effect of dietary astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture*, v. 133, p. 91-102, 1995.
- THOMPSON, I.; FLETCHER, T.C.; HOULIHAN, D.F.; SECOMBES, C.J. Effect of dietary vitamin A intake on the immunocompetence of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish physiology and biochemistry*, v. 12, p. 513-523, 1994.
- WIEDERMANN, U.; CHEN, X.-J.; ENERBÄCK, L.; HANSON, L.A.; KAHU, H.; DAHLGREN, U.I. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 44, p. 578-584, 1996.
- WOLBACH, S.B. & HOWE, P.R. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *Journal of Experimental Medicine* v. 42, p. 753-777, 1925.

# Capítulo 2

## DESEMPENHO PRODUTIVO DE ALEVINOS DE TILÁPIAS DO NILO ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE VITAMINA A

### Resumo

O efeito da vitamina A sobre os parâmetros de desempenho da tilápia do Nilo foi avaliado em um experimento com duração de 130 dias. Trezentos e vinte alevinos de tilápia do Nilo ( $7,43 \pm 0,19$ g) foram aleatoriamente distribuídos em 40 aquários de fibra de vidro com volume total de 250L e alimentados com dieta prática contendo níveis crescentes de vitamina A (0, 200, 400, 800, 1.600, 3.200, 6.400, 12.800 UI de vit. A/kg da dieta). A fonte de vitamina utilizada foi o acetato de retinol (Rovimix<sup>®</sup> A 1000). Ao final do período experimental os peixes foram pesados e a ração quantificada para a avaliação do ganho de peso médio, conversão alimentar aparente (CAA), consumo diário de ração, porcentagem de sobrevivência, taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência protéica (TEP) e taxa de retenção protéica (TRP). Foi observado efeito quadrático ( $P < 0,01$ ) para todas as variáveis com o aumento do nível de vitamina A nas dietas com exceção da CAA e TEP. Os peixes alimentados com as dietas não suplementadas apresentaram reduzida TEP e piores índices de CAA. Sinais de deficiência de vitamina A observados neste estudo foram: apatia, natação errática, exoftalmia, petéquias hemorrágicas localizadas na base da nadadeira caudal e superfície corporal, e presença de ascite na cavidade abdominal. A presença de níveis adequados de vitamina A é essencial para o adequado crescimento da tilápia do Nilo e a exigência com base no ganho de peso e taxa de retenção protéica foi de 4.704 e 5.300 UI de vit. A/kg da dieta, respectivamente.

**Palavras-chave:** retinol, ganho de peso, retenção protéica, vitaminas, *Oreochromis niloticus*

## **GROWTH PERFORMANCE OF NILE TILAPIA FINGERLINGS FED DIETS CONTAINING DIFFERENT VITAMIN A LEVELS**

### **Abstract**

A 130-day feeding trial was undertaken to evaluate the effect of vitamin A on growth performance of sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 320 Nile tilapia fingerlings with  $7.49 \pm 0.19$ g weight (mean $\pm$ SD) were randomly stocked into 40 250L-aquaria and fed practical diets containing graded levels of vitamin A (0; 200; 400; 800; 1,600; 3,200; 6,400; 12,800 IU vit. A/kg diet). Vitamin A source was retinol acetate (Rovimix<sup>®</sup> A 1000). At the end of the experimental period fish and diets were weighed to evaluate weight gain (WG), feed conversion ratio (FCR), survival (SUR), specific growth rate (SGR), protein efficiency ratio (PER) and protein retention (PR). All growth parameters showed quadratic effect ( $P < 0.01$ ) according to vitamin A level regardless the FCR and PER. Fish fed the non-supplemented diet showed reduced PER and higher FCR. Clinical signs of vitamin A deficiency observed in this study were resting and abnormal swimming behavior, exophthalmia, hemorrhages at the base of fins and on skin and serous fluids in abdominal cavity. Adequate vitamin A levels are necessary for normal Nile tilapia growth and vitamin A requirement based on WG and PR is 4,704 and 5,300 IU vit. A/kg diet, respectively.

**Key Words:** retinol, weight gain, protein retention, vitamins, *Oreochromis niloticus*

## Introdução

As vitaminas são essenciais para o funcionamento normal do organismo, pois fazem parte de várias reações importantes do metabolismo animal. Estas agem, principalmente, como co-fatores de reações bioquímicas vitais e influenciam o estado de saúde do animal.

Vitamina A é a denominação dada a todos os compostos com atividade de retinóides cuja característica é ser solúvel em solventes orgânicos sendo classificada no grupo das vitaminas lipossolúveis. Esta vitamina está envolvida em diversos aspectos do metabolismo possuindo diferentes funções no organismo animal. Age como hormônio esteróide pela regulação do processo de crescimento dos tecidos devido a seu papel na síntese de glicoproteínas e glicosaminoglicanos, e na diferenciação celular. Da mesma forma, alguns compostos com atividade em vitamina A possuem papel importante na manutenção normal dos processos visuais (Devlin 2002). Esta vitamina está envolvida ainda com a manutenção da eritropoiese e do metabolismo do ferro, manutenção da integridade dos tecidos epiteliais, e regulação direta ou indireta de mais de 500 genes pela ativação de outros fatores de transcrição (Balmer & Blomhoff 2002).

Apesar da sua importância para o desenvolvimento normal dos organismos, estudos são ainda escassos para várias espécies de peixes com relação à sua exigência nutricional. Estudos conduzidos têm indicado que a exigência de vitamina A para peixes varia de 1000 a 8000 UI kg<sup>-1</sup> (Halver 1982; Halver 1989; Mohamed et al. 2003; Moren et al. 2004; Hernandez et al. 2004; Hernandez et al., 2005; Hu et al. 2006). Embora a exigência para tilápia do Nilo esteja descrita na literatura como variando entre 5850 a 6970 UI kg<sup>-1</sup> (Hu et al. 2006), resultados publicados anteriormente demonstraram que o nível de 5000 UI kg<sup>-1</sup> proporcionou melhor ganho de peso (Saleh et al. 1995).

Estudos abordando a exigência em vitamina têm sido conduzidos usando dietas purificadas ou semipurificadas de forma a reduzir a influência de fatores extrínsecos nos resultados. Apesar destes estudos serem mais precisos, seus resultados geralmente são imprevisíveis quando extrapolados para condições práticas. Desta forma, a utilização de ingredientes convencionais e do processo de extrusão na confecção das dietas em estudos de exigência em vitaminas podem tornar as condições mais reais, visto as



condições experimentais serem semelhantes às utilizadas no processo de produção comercial de tilápias.

Com base no exposto, este estudo foi conduzido com a finalidade de avaliar o efeito de níveis crescentes de vitamina A sobre o desempenho de tilápias do Nilo utilizando dietas práticas a base de farelo de soja e quirera de arroz.

## **Material e Métodos**

### *Dietas*

Uma dieta basal (Tabela 1) foi confeccionada usando ingredientes convencionais. As dietas foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais da tilápia do Nilo (NRC 1993). O suplemento vitamínico e mineral adicionado era isento de vitamina A. A fonte de vitamina A utilizada foi o acetato de retinila com 1000.000 UI g<sup>-1</sup> do produto (Rovimix<sup>®</sup> A 1000). A fonte de vitamina A foi diluída em amido de forma a facilitar sua incorporação nas dietas, a qual foi feita em substituição a quantidades de quirera de arroz para se obter os seguintes níveis: 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 e 12800 UI kg<sup>-1</sup>. A dieta não suplementada com vitamina A foi utilizada como controle negativo.

Todos os ingredientes foram moídos até se apresentarem com diâmetro inferior a 500 µm. As dietas foram mecanicamente homogeneizadas e adicionou-se água a 25% do peso seco em misturador automático (Ação Científica, Piracicaba, Brasil) e extrusada à 99-120 °C em extrusora laboratorial de rosca simples (Extrutech, Ribeirão Preto, Brasil) de forma a obter pelétes de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro. As dietas foram secas (55°C por 12 horas) e armazenadas em freezer à -18 °C até a utilização. No início do período experimental as dietas foram quebradas e classificadas em peneiras com diâmetro entre malhas condizente com o tamanho dos peixes.

### *Peixes e procedimento experimental*

Alevinos revertidos de tilápia do Nilo foram adquiridos de piscicultura comercial (Santo Antonio do Aracanguá, SP, Brasil) e aclimatizados às condições laboratoriais em quatro aquários de 250L.

Os peixes foram alimentados com a dieta basal (sem suplementação de vitamina A) durante 15 dias antes do início do experimento com o objetivo de depletar as reservas de vitamina A. No início do experimento 25 peixes foram amostrados para a análise de proteína total da carcaça. Estes peixes foram anestesiados por imersão em solução alcoólica de benzocaína à  $67 \text{ mg L}^{-1}$  até completa sedação e morte.

O experimento de desempenho teve duração de 130 dias. Inicialmente, 320 alevinos de tilápia do Nilo com peso médio inicial de  $7,49 \pm 0,19\text{g}$  foram aleatoriamente distribuídos em 40 aquários de 250L. Os aquários encontravam-se conectados a um sistema de recirculação fechada de água com filtro biológico com a finalidade de remover possíveis sobras de ração, fezes e reduzir a concentração de amônia. A vazão média nos aquários era de  $6,59 \text{ L min}^{-1}$ . A temperatura da água foi controlada por meio de termostato digital e mantida em  $26,0 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$ . As medidas de oxigênio dissolvido e da temperatura da água foram realizadas semanalmente em quatro aquários, aleatoriamente; as fezes acumuladas foram removidas por sifonamento.

Cada dieta foi distribuída aleatoriamente em cinco aquários. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente. A frequência alimentar utilizada foi de quatro vezes ao dia sendo as dietas ofertadas às 0800, 1100, 1400 e 1700 h. Durante o período experimental os parâmetros de qualidade da água foram mantidos na faixa ótima para o cultivo de tilápias (pH  $7,0 \pm 0,5$ ; oxigênio dissolvido  $6,2 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  e amônia ( $\text{NH}_3$ )  $147,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ). Todos os aquários foram mantidos sob fotoperíodo natural.

Durante todo o período experimental a mortalidade dos peixes foi computada e os sinais clínicos de deficiência foram observados de acordo com Hilton (1981). Ao final do período experimental, os peixes permaneceram em jejum por 24 horas, sendo pesados e examinados para identificação de sinais de deficiência de vitamina A. Os peixes foram anestesiados como descrito anteriormente e cinco animais de cada aquário foram aleatoriamente capturados. Os peixes foram eviscerados e os fígados removidos e armazenados em nitrogênio líquido para posterior análise do conteúdo de vitamina A. O restante do peixe foi moído e utilizado para determinação do conteúdo total de proteína na carcaça.

#### *Procedimento analítico e análise de vitamina A*

O conteúdo de umidade, lipídeos e cinzas das dietas, e proteína bruta das carcaças e dietas foram determinados de acordo com os protocolos do AOAC (AOAC 1995).

A determinação da vitamina A no fígado e nas dietas foi realizada de acordo com Nöll (1996) e Bankson et al. (1986). A técnica utilizada foi análise de vitamina A realizada por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC. Inicialmente, as amostras foram convertidas em retinol por meio de hidrólise alcalina e após este processo foram extraídas em solvente apropriado e então diluições sucessivas foram realizadas para serem aplicadas à cromatografia e quantificadas com padrão externo.

#### *Análise estatística*

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e cinco repetições. Os dados de ganho de peso médio, taxa de crescimento específico, consumo diário de ração, taxa de sobrevivência, taxa de eficiência protéica e taxa de retenção protéica de cada tratamento foram analisados por meio da ANAVA ao nível de significância de 5%. Nos casos em que o modelo de regressão não foi significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o teste de comparação de médias de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do pacote computacional SAS (SAS 8.12). O modelo quadrático foi aplicado aos dados de desempenho para determinar a exigência em vitamina A conforme proposto por Shearer (2000).

#### **Resultados**

Os valores médios dos parâmetros de desempenho de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A por 130 dias estão apresentados na Tabela 2. Todos os parâmetros de crescimento avaliados foram influenciados ( $P < 0,05$ ) pelo nível de vitamina A na dieta. O modelo de regressão quadrático foi o que melhor se ajustou aos dados de ganho de peso médio (GPM) (Fig. 1), consumo diário de ração (CDR) (Fig. 2), sobrevivência (SBV) (Fig. 3), taxa de crescimento específico (TCE) (Fig. 4) e taxa de retenção protéica (TRP) (Fig. 5), enquanto para a conversão alimentar aparente (CAA) e a taxa de eficiência protéica (TEP) nenhum modelo de regressão mostrou-se significativo. A ausência de

suplementação de vitamina A prejudicou a CAA, entretanto não foi observada diferença significativa para os peixes alimentados com os demais níveis de vitamina A estudados. O mesmo comportamento foi observado para a TEP, entretanto os peixes alimentados com os dois maiores níveis (6.400 e 12.800 UI kg<sup>-1</sup>) apresentaram maiores valores quando comparado aos peixes alimentados com 0 e 200 UI kg<sup>-1</sup>. Os níveis de vitamina A estimados com base nas equações de regressão que promoveram a obtenção de maiores valores para GPM, CDR, SBV, TCE, e TRP foram, respectivamente, 4.704, 4.681, 4.528, 3.802 e 5.300 UI kg<sup>-1</sup> da dieta.

A sobrevivência dos animais foi severamente afetada no tratamento sem suplementação de vitamina A. Sinais clínicos de deficiência de vitamina A foram observados em todos os tratamentos, com exceção dos níveis de 3.200, 6.400 e 12.800 UI kg<sup>-1</sup>. Não foi possível detectar vitamina A nas amostras de fígado.

## **Discussão**

O conteúdo de vitamina A determinado na análise das rações foi, de maneira geral, metade da quantidade adicionada às dietas (Tabela 2). Não foi possível detectar esta vitamina nos tratamentos 0, 200, 400 e 800 UI kg<sup>-1</sup> da dieta. Apesar da fonte de vitamina utilizada neste estudo apresentar alta estabilidade ao processo de extrusão (acima de 90%, DSM products), dados técnicos têm demonstrado que a maioria das fontes de vitamina A presentes no mercado apresenta 77% de retenção após o processo de extrusão (BASF, 2001). Entretanto, Barrows et al. (2008) observaram diferentes valores de retenção para a vitamina A, ácido fólico e tiamina em dietas extrusadas para a truta arco-íris. Estes autores obtiveram taxas de retenção para vitamina A variando de 11 à 59%, enquanto a literatura tem descrito valores de retenção da ordem de 87% (Gadient & Fenster 1994).

A extrusão é um método de processamento da dieta extremamente agressivo que tem demonstrado causar destruição significativa das vitaminas em suplementos (Anderson & Sunderland 2002) e ingredientes (Athar et al. 2006). Este fator associado ao período de armazenamento da dieta devem ter influenciado para o menor conteúdo determinado desta vitamina. Visto a totalidade dos estudos serem conduzidos utilizando dietas peletizadas, torna-se difícil a comparação.

O desempenho produtivo foi significativamente afetado pelo nível de vitamina A suplementado na dieta. Os peixes alimentados com a dieta ausente de suplementação em vitamina A apresentaram o menor ganho de peso médio. O valor de exigência estimado no presente estudo para o GPM ( $4.704 \text{ UI kg}^{-1}$ ) foi inferior quando comparado aos descritos por Hu et al. (2006) (entre  $5.850$  e  $6.970 \text{ UI kg}^{-1}$ ) para híbridos de tilápia. Este menor valor de exigência pode ser devido à diferença entre os períodos experimentais dos estudos, uma vez que neste estudo os peixes foram alimentados por 16 semanas, enquanto no estudo supracitado, o período experimental foi de 10 semanas. Essa hipótese pode ser confirmada com base no valor de exigência ( $5000 \text{ UI}$ ) obtido por Saleh et al. (1995), os quais utilizaram período experimental de 14 semanas. Diferenças entre os tipos de dietas e genética dos peixes devem ser consideradas. Deve-se considerar, ainda, que diferenças no modelo estatístico utilizado para estimar a exigência de nutrientes podem conduzir a diferenças significativas entre estudos (Shearer, 2000)

Os peixes que apresentaram os menores consumo de ração foram àqueles alimentados com as dietas suplementadas com níveis de  $0$  à  $1.420 \text{ UI kg}^{-1}$ . Este reduzido consumo de ração deve-se, principalmente, ao fato deste ser um dos quadros sintomáticos de deficiência de vitamina A, exacerbado pelo efeito deletério da ausência deste nutriente.

Apesar de não ter sido observado efeito significativo da regressão sobre a conversão alimentar aparente, as médias seguem o mesmo comportamento das demais variáveis estudadas. Isto pode ser resultado da alta variação nos dados observados para o tratamento sem suplementação de vitamina A. Entretanto, os peixes suplementados com  $3560$  e  $6470 \text{ UI kg}^{-1}$  determinaram melhores valores de CAA embora esta diferença não tenha sido significativa entre os demais tratamentos suplementados com vitamina A. Comportamento semelhante foi observado para a taxa de eficiência protéica. Resultados similares foram observados para tilápia do Nilo (Hu et al. 2006) e o greasy grouper *Epinephelus tauvina* no qual o nível de  $3764 \text{ UI kg}^{-1}$  proporcionou os melhores valores de TEP e CAA (Mohamed et al. 2003).

A baixa utilização da dieta pode ser efeito secundário da deficiência de vitamina A. Devido a reduzida ingestão do alimento e menor taxa de crescimento dos tecidos, pode-se inferir que a utilização do alimento fica prejudicada pois as células do sistema

digestório apresentam-se incapazes de desenvolver suas funções normais e promover o adequado aproveitamento dos nutrientes.

A porcentagem de sobrevivência dos animais foi significativamente afetada pelo nível de vitamina da dieta. As menores taxas de sobrevivência foram observadas nos tratamentos sem suplementação, acarretando taxas de até 77,50% de mortalidade. Altas taxas de mortalidade têm sido relatadas em peixes alimentados com dietas ausentes em vitamina A (Halver, 1982; Saleh et al., 1995; Hu et al., 2006), porém não tão proeminentes como às observadas neste estudo. Esta diferença pode residir na adição de óleo de peixe feita na maioria dos estudos, enquanto esta pesquisa utilizou somente o óleo de soja como fonte de ácidos graxos, exacerbando a deficiência desta vitamina. Desta forma, Lall & Parazo (1995) ressaltaram que certos óleos e farinhas de peixe apresentam altos níveis de vitamina A podendo ocasionar hipervitaminose quando sua inclusão é alta nas dietas, indicando que as dietas ausentes em vitA desses estudos poderiam ter quantidade de vitamina A necessária para suportar a manutenção da vida do animal.

Entre os sinais clínicos de deficiência de vitamina A observados neste estudo pode-se ressaltar apatia, natação errática, exoftalmia, petéquias hemorrágicas na base da nadadeira caudal e superfície corporal, redução da secreção de muco e presença de ascite na cavidade abdominal. Além dos sinais clássicos de deficiência de vitamina A observados, alta taxa de infecção por organismos patogênicos foram observadas nos animais na avaliação *post mortem*. Infecções recorrentes são efeitos secundários da deficiência de vitamina A, devido a esta vitamina estar envolvida na manutenção da integridade do sistema imune (Hernandez et al. 2007; Stephensen 2001; Thurnham 1989) e higidez do animal.

Neste estudo, o nível de 5.300 UI de vit. A  $\text{kg}^{-1}$  da dieta proporcionou maior retenção de proteína na carcaça. Hu et al. (2006) observaram que o nível de vitamina A que proporcionou maior quantidade de proteína na carcaça foi de 6.000 UI  $\text{kg}^{-1}$  da dieta. Níveis maiores de vitamina A podem ser necessários para a síntese protéica uma vez que esta vitamina participa da regulação do crescimento e diferenciação celular. Os efeitos biológicos dos retinóides (metabólitos da vitamina A) são exercidos principalmente por meio da ativação de dois grupos de receptores no núcleo da célula, os receptores para ácido retinóico (RAR) e os receptores X de retinóides (RXR) (Ross et

al. 2000). Estes receptores são ativados por diferentes isômeros do ácido retinóico produzindo reação em cadeia que culmina na ativação ou supressão da transcrição de genes que codificam a síntese de determinadas proteínas do corpo. Desta forma, esta pode ser a via pela qual a vitamina A afeta a síntese e deposição de proteína nos tecidos.

Devido a participação da vitamina A em vários aspectos do metabolismo animal e sendo um dos fatores que regulam o crescimento e diferenciação celular, sua ausência ou deficiência nas dietas promovem reduzido crescimento e prejuízos ao metabolismo animal (Devlin, 1998; Sherman, 1986), fato este observado nesta pesquisa. Esta influência sobre o desenvolvimento e diferenciação celular reside na essencialidade do ácido retinóico para o início da expressão de certas famílias de genes que estão envolvidas neste processo (Joore et al. 1994; Krumlauf 1994; Conlon 1995; Haga et al. 2002). A regulação da expressão gênica de determinados tipos de genes por retinóides tem sido relatada em algumas espécies de peixes (Suzuki et al. 1998, 2000; Haga et al. 2002, 2003; Villeneuve et al. 2005), porém estudos são ainda escassos.

A presença de níveis adequados de vitamina A na dieta é essencial para o crescimento normal da tilápia do Nilo, e com base no ganho de peso e taxa de retenção protéica pode-se estimar que a exigência desta vitamina encontra-se entre 4.704 e 5.300 UI de vit. A kg<sup>-1</sup> da dieta, utilizando dietas práticas. A ausência desta vitamina nas dietas pode ocasionar elevada taxa de mortalidade em um curto período de tempo.

## Referências

- Anderson, J.S. & Sunderland, R. (2002) Effect of extruder temperature and dryer processing temperature on vitamin C and E and astaxanthin stability. *Aquaculture* 207, 137–149.
- AOAC. Official Methods of Analysis (16th Ed.). (1995) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Athar, N., Hardacre, A., Taylor, G., Clark, S., Harding, R. & McLaughlin, J. (2006) Vitamin retention in extruded food products. *J. Food Comp. Anal.* 19, 379–383.
- Balmer, J.E. & Blomhoff, R. (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*, 43, 1773-1808.

- Bankson, D.D.; Russell, R.M. & Sadowski, J.A. (1986) Determination of retinyl esters and retinol in serum or plasma by normal phase liquid chromatography: method and applications. *Clinical Chemistry*, v. 32, p. 35-40.
- Barrows, F.T., Gaylord, G.T., Sealey, W.M., Porter, L. & Smith, C.E. (2008) The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 283, 148-155.
- Basf. (2001) Vitamin stability in premixes and feeds: a practical approach. 6<sup>a</sup> ed., 24p.
- Conlon, R.A. (1995) Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet*, 11, 314-319.
- Devlin, T. M. (1998) *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. Ed. Edgard Blücher. São Paulo-SP, 2002. 1007p.
- Gadiant, M. & Fenster, R. (1994) Stability of ascorbic acid and other vitamins in extruded feeds. *Aquaculture* 124, 207–211.
- Haga, Y., Suzuki, T. & Takeuchi, T. (2002) Retinoic acid isomers produce malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool Sci*, 19, 1105-1112.
- Haga, Y., Suzuki, T., Kagechika, H. & Takeuchi, T. (2003) A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder. *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 221, 381-392.
- Halver, J.E. (1982) The vitamins required for cultivated salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* V.73, p. 43-50.
- Halver, J.E. (1989) The vitamins. In: *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, EUA, p. 32-102., 1989.
- Hernandez, L.H.H., Teshima, S., Ishikawa, M. & Koshio, S. (2004) Effects of dietary vitamin A on juvenile Red Sea Bream *Chrysophrys major*. *J World Aquac Soc*, 35, 436-444.
- Hernandez, L.H.H., Teshima, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Tanaka, Y. & Alam, S. (2007) Effects of vitamin A on growth, serum anti-bacterial activity and transaminase activities in the juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 262, 444-450.



- Hernandez, L.H.H., Teshima, S.-I, Ishikawa, M., Alam, S., Koshio, S. & Tanaka, Y. (2005) Dietary vitamin A requirements of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquac Nutr*, 11, 03-09.
- Hu, C.-J., Chen, S.-M., Pan, C.-H., Huang, C.-H. (2006) Effects of dietary vitamin A or  $\beta$ -carotene concentrations on growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*  $\times$  *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*. V. 253, p. 602-607.
- Joore, J., Van Der Lans, G.B.L.J., Lanser, P.H., Vervaart, J.M., Zivkovic, D., Speksnijder, J.E. & Kruijer, W. (1994) Effects of retinoic acid on the expression of retinoic acid receptors during zebrafish embryogenesis. *Mech Dev*, 46, 137-150.
- Krumlauf, R. (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78, 191-201.
- Lall, S.P., Parazo, M.P. (1995) Vitamins in fish and shellfish. In: *Fish and fishery products* (Reuter, A. Ed.). CAB international, Oxon, UK, 1995. pp. 157-186.
- Mohamed, J.S.; Sivaram, V.; Christopher, R.; Marian, M.P.; Murugardass, S.; Hussain, M.R. (2003) Dietary vitamin A requirement of juvenile greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). *Aquaculture*, v. 219, p. 693-701.
- Moren, M.; Opstad, I.; Berntssen, M.H.G.; Zambonino Infante, J.-L.; Hamre, K. (2004) An optimum level of vitamin A supplements for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. *Aquaculture*, v. 235, p. 587-599.
- Nöll, G.N. (1996) High-performance liquid chromatographic analysis of retinal and retinol isomers. *Journal of chromatography*, v. 721, p. 247-259.
- NRC (National Research Council) (1993) Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC, 114 pp.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C. & De Luca, L.M. (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev*, 80, 1021-1054.
- Saleh, G., Eleraky, W., Gropp, J.M. (1995) A short note on the effects of vitamin A hypervitaminosis and hypovitaminosis on health and growth of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Ichthyol. Short communication*. V. 11, p. 382-385.
- Shearer, K.D. (2000) Experimental design, statistical analysis and modelling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. *Aquac Nutr*, 6, 91-102.
- Sherman, M.I. *Retinoid and cell differentiation*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.
- Stephensen, C.B. (2001) Vitamin A, infection, and immune function. *Annual Review of Nutrition*, v. 21, p. 167-192.

- Suzuki, T., Oohara, I. & Kurowaka, T. (1998) Hoxd-4 expression during pharyngeal arch development in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos and effects of retinoic acid on expression. *Zool Sci*, 15, 57-67.
- Suzuki, T., Srivastava, A.S., I. & Kurowaka, T. (2000) Experimental induction of jaw, gill and pectoral fin malformations in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, larvae. *Aquaculture*, 185, 175-187.
- Thurnham, D.I. (1989) Vitamin A deficiency and its role in infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 721-723.
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Le Delliou, H., Cahu, C.L. & Zambonino-Infante, J.L. (2005) Dietary levels of all-*trans* retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br J Nutr*, 93, 791-801.

Tabela 1. Composição percentual e proximal da dieta basal

| Ingrediente                      | g kg <sup>-1</sup> |
|----------------------------------|--------------------|
| Farelo de soja                   | 622,0              |
| Quirera de arroz                 | 287,5              |
| Celulose                         | 7,0                |
| DL-Metionina                     | 4,5                |
| Treonina                         | 2,5                |
| Óleo de soja                     | 10,0               |
| Fosfato bicálcico                | 59,9               |
| Vitamina C <sup>1</sup>          | 0,4                |
| NaCl <sup>2</sup>                | 1,0                |
| Suplemento vit/min <sup>3</sup>  | 5,0                |
| BHT <sup>4</sup>                 | 0,2                |
| Composição proximal <sup>5</sup> | g kg <sup>-1</sup> |
| Umidade                          | 81,3               |
| Proteína bruta                   | 306,2              |
| Lipídeo                          | 41,8               |
| Cinzas                           | 111,2              |
| Fibra bruta                      | 51,7               |

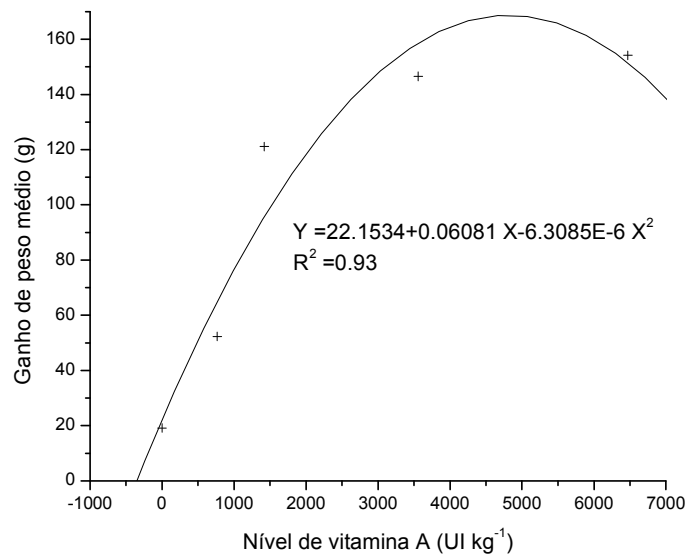
<sup>1</sup> Vitamina C polifosfatada (DSM Stay C 35,0% atividade); <sup>2</sup> Cloreto de sódio; <sup>3</sup> Suplemento vitamínico e mineral (Supre Mais, níveis kg<sup>-1</sup> do produto): Vitamina D<sub>3</sub>, 200.000 UI; Vitamina E 1.200 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 2.400 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 4.800 mcg; Vitamina B<sub>6</sub>, 4.800 mg; Pantotenato de cálcio, 12.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Ácido fólico, 1.200 mg; Biotina, 48 mg; Cloreto de colina, 108 g; Cobalto, 10 mg; Cobre, 3.000 mg; Sulfato ferroso heptahidratado, 50.000 mg; Iodo, 100 mg; Manganês, 20.000 mg; Selênio, 100 mg; Sulfato de zinco, 30.000 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g; <sup>4</sup> β-hidroxi tolueno – antioxidante; <sup>5</sup> analisado.

Tabela 2. Ganho de peso médio (GPM), consumo diário de ração (CDR), conversão alimentar aparente (CAA), sobrevivência (SBV), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência protéica (TEP) e taxa de retenção protéica (TRP) de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A ( $n = 5$ , média  $\pm$  desvio padrão)

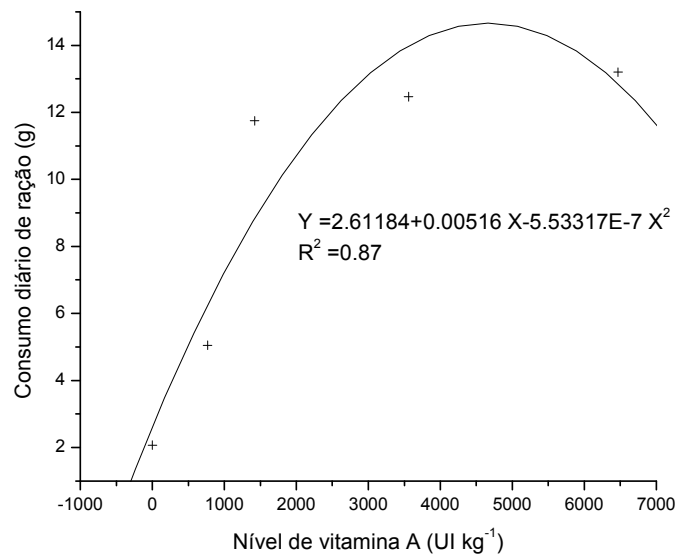
| Tratamento   | Vit. A<br>(analisado) | GPM <sup>1</sup><br>(g) | CDR <sup>2</sup><br>(g) | CAA <sup>3</sup>                | TCE <sup>4</sup><br>(%) | TEP <sup>5</sup><br>(%)           | TRP <sup>6</sup><br>(%) | SBV <sup>7</sup><br>(%) |
|--------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 UI         | nd*                   | 12,79<br>$\pm 4,87$     | 1,67<br>$\pm 0,12$      | 2,33 <sup>a</sup><br>$\pm 0,69$ | 0,74<br>$\pm 0,18$      | 1,66 <sup>c</sup><br>$\pm 0,53$   | 25,80<br>$\pm 0,37$     | 22,50<br>$\pm 10,46$    |
| 200 UI       | nd                    | 15,62<br>$\pm 3,43$     | 1,72<br>$\pm 0,32$      | 1,81 <sup>b</sup><br>$\pm 0,22$ | 0,87<br>$\pm 0,12$      | 1,99 <sup>bc</sup><br>$\pm 0,26$  | 31,43<br>$\pm 3,15$     | 32,50<br>$\pm 18,96$    |
| 400 UI       | nd                    | 20,99<br>$\pm 5,17$     | 2,18<br>$\pm 0,33$      | 1,73 <sup>b</sup><br>$\pm 0,26$ | 1,01<br>$\pm 0,14$      | 2,10 <sup>abc</sup><br>$\pm 0,33$ | 33,27<br>$\pm 1,70$     | 35,00<br>$\pm 10,46$    |
| 800 UI       | nd                    | 27,05<br>$\pm 9,70$     | 2,72<br>$\pm 0,60$      | 1,73 <sup>b</sup><br>$\pm 0,52$ | 1,16<br>$\pm 0,19$      | 2,18 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,50$  | 37,76<br>$\pm 1,71$     | 42,50<br>$\pm 11,18$    |
| 1600 UI      | 767 UI                | 52,29<br>$\pm 18,53$    | 5,05<br>$\pm 1,29$      | 1,61 <sup>b</sup><br>$\pm 0,18$ | 1,57<br>$\pm 0,23$      | 2,24 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,26$  | 41,46<br>$\pm 2,01$     | 60,00<br>$\pm 28,50$    |
| 3200 UI      | 1420 UI               | 121,13<br>$\pm 27,48$   | 11,75<br>$\pm 3,71$     | 1,56 <sup>b</sup><br>$\pm 0,14$ | 2,17<br>$\pm 0,16$      | 2,31 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,19$  | 39,40<br>$\pm 0,65$     | 82,50<br>$\pm 20,92$    |
| 6400 UI      | 3560 UI               | 146,55<br>$\pm 19,22$   | 12,47<br>$\pm 1,26$     | 1,39 <sup>b</sup><br>$\pm 0,10$ | 2,32<br>$\pm 0,10$      | 2,58 <sup>a</sup><br>$\pm 0,18$   | 46,01<br>$\pm 4,96$     | 92,50<br>$\pm 11,18$    |
| 12800 UI     | 6470 UI               | 154,16<br>$\pm 23,32$   | 13,20<br>$\pm 2,18$     | 1,39 <sup>b</sup><br>$\pm 0,08$ | 2,36<br>$\pm 0,11$      | 2,57 <sup>a</sup><br>$\pm 0,16$   | 49,01<br>$\pm 3,74$     | 92,50<br>$\pm 6,85$     |
| Efeito lin.  |                       | $P < 0,01$              | $P < 0,01$              | ns                              | $P < 0,01$              | ns                                | $P < 0,01$              | $P < 0,01$              |
| Efeito quad. |                       | $P < 0,01$              | $P < 0,01$              | ns                              | $P < 0,01$              | ns                                | $P < 0,05$              | $P < 0,01$              |

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes. ns – não significativo.\* nd – não detectado.

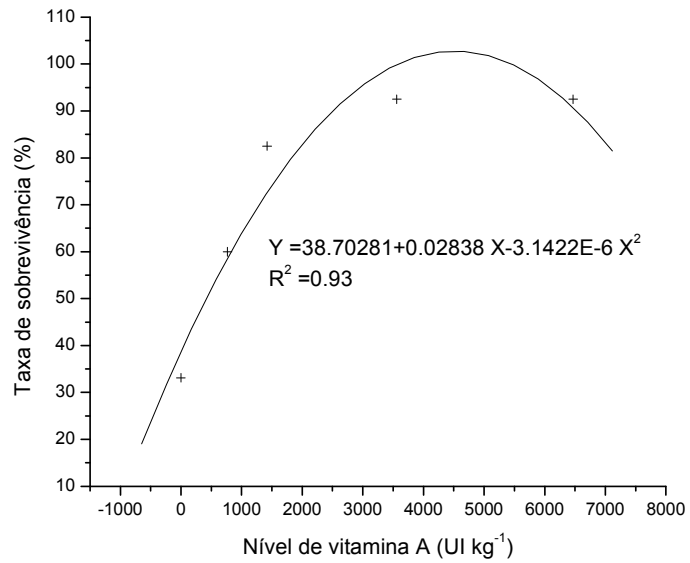
<sup>1</sup>GPM = peso final – peso inicial; <sup>2</sup>CDR = CMR/t, onde CMR é o consumo médio de ração por peixe, e t é o período experimental; <sup>3</sup>CAA = consumo de ração do lote/ganho de peso do lote; <sup>4</sup>TCE = (Ln do peso final – Ln do peso inicial)  $\times$  100/período experimental; <sup>5</sup>TEP = ganho de peso/proteína ingerida; <sup>6</sup>TRP = 100  $\times$  [(PB da carcaça final  $\times$  peso final) – (PB da carcaça inicial  $\times$  peso inicial)/consumo de proteína digestível]; <sup>7</sup>SBV = (número final de peixes  $\times$  100)/número inicial de peixes



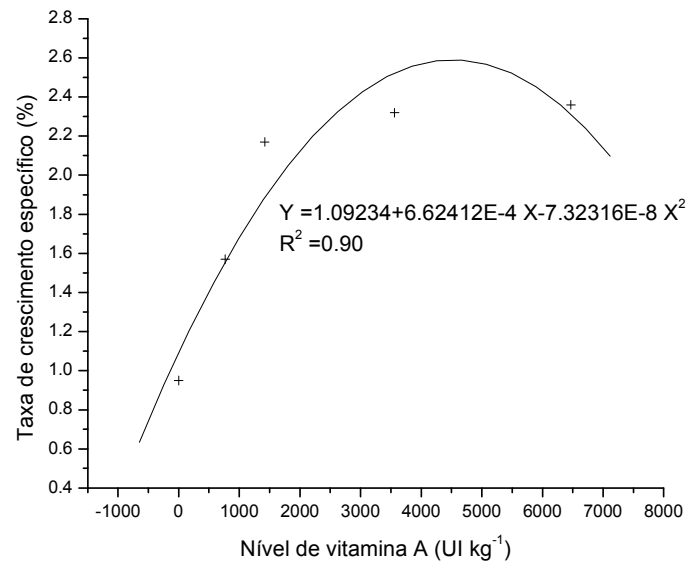
**Figura 1.** Ganho de peso médio de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A.



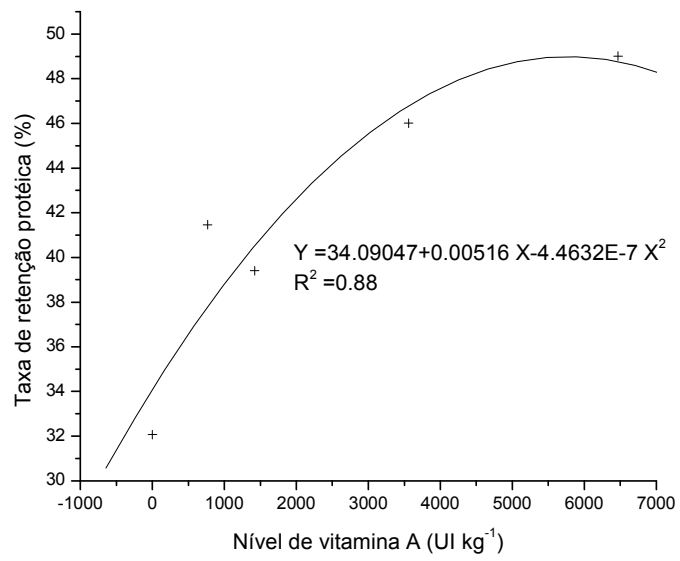
**Figura 2.** Consumo diário de ração de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A.



**Figura 3.** Taxa de sobrevivência de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A.



**Figura 4.** Taxa de crescimento específico de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A.



**Figura 5.** Taxa de retenção protéica de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis de vitamina A.

# Capítulo 3



**PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DE TILÁPIAS DO NILO ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE VITAMINA A E SUBMETIDAS À ESTÍMULO PELO FRIO E DESAFIADAS COM *Aeromonas hydrophila***

**RESUMO** - O efeito da vitamina A sobre o perfil hematológico, parâmetros do sistema imune e perfil de proteínas plasmáticas da tilápia do Nilo foi avaliado antes e após estímulo pelo frio e desafio com *A. hydrophila*. 320 alevinos de tilápia do Nilo ( $7,43 \pm 0,19$ g) foram aleatoriamente distribuídos em 40 aquários de fibra de vidro com volume total de 250L e alimentados com dieta prática contendo níveis crescentes de vitamina A (0, 200, 400, 800, 1.600, 3.200, 6.400, 12.800 UI de vit. A/kg da dieta). A fonte de vitamina utilizada foi o acetato de retinol (Rovimix<sup>®</sup> A 1000). Ao final do período experimental foi coletado sangue dos peixes para avaliar a atividade do *burst* respiratório de monócitos (produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO), perfil hematológico e o perfil de proteínas do soro [proteína plasmática total (PPT), albumina (ALB), globulina (GLOB) e relação albumina:globulina (A:G)]. Foi realizado estímulo pelo frio durante cinco dias e desafio experimental com *Aeromonas hydrophila* durante 15 dias. Sinais clínicos de deficiência de vitA em tilápias do Nilo incluem neutropenia, redução do número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina. PPT, GLOB e A:G apresentaram efeito quadrático ( $P < 0,01$ ) de acordo com o nível de vitamina A da dieta, com exceção da fração albumina do plasma. Os peixes que receberam a dieta com 6.400 UI de vit. A/kg apresentaram as menores produções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO, entretanto os peixes dos tratamentos suplementados com 800 e 3.200 UI/kg apresentaram os maiores valores. A vitamina A influencia a atividade do *burst* respiratório de monócitos de tilápias do Nilo e com base no perfil de proteínas plasmáticas pode-se estimar que o nível de 4.138 UI de vit. A/kg de ração proporciona melhores parâmetros de saúde.

**Palavras-chave:** retinol, *burst* respiratório, proteína plasmática, hematologia, *Oreochromis niloticus*

**IMMUNE AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF NILE TILAPIA FED  
DIETS CONTAINING GRADED LEVELS OF VITAMIN A AND SUBMITTED  
TO COLD-INDUCED STRESS AND *Aeromonas hydrophila* CHALLENGE**

**ABSTRACT** - A 130-day feeding trial was undertaken to evaluate the effect of vitamin A on hematological and immune parameters, and plasma protein profile of sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 320 Nile tilapia fingerlings with  $7.49 \pm 0.19$ g weight (mean $\pm$ SD) were randomly stocked into 40 250L-aquaria and fed practical diets containing graded levels of vitamin A (0, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800 IU vit. A/kg diet). Vitamin source was retinol acetate (Rovimix<sup>®</sup> A 1000). At the end of the experimental period fish were bled and samples collected to evaluate peripheral blood monocytes burst respiratory activity (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO production), plasma protein profile [total plasma protein (TPP), albumin (ALB), globulin (GLOB) and albumin to protein ratio (A:G ratio)] and hematological parameters. A cold induced stress and experimental infection with *A. hydrophila* were performed during five and 15 days, respectively. Clinical signs of vitA deficiency in Nile tilapia include neutropenia, reduced red blood cell count, hematocrit and hemoglobin. TPP, GLOB and A:G ratio showed quadratic effect ( $P < 0.01$ ) according to vitamin A level regardless the albumin fraction. 6,400 IU vit. A/kg produced the lowest NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production values, however treatments supplemented with 800 and 3200 IU/ kg diet provided the highest ones. Vitamin A influence monocyte burst respiratory activity in Nile tilapia and the vitamin level estimated for high TPP, GLOB and A:G ratio values were 4,138 IU vit. A/kg diet.

**Key Words:** retinol, burst respiratory activity, plasma protein, hematology, *Oreochromis niloticus*, hematology

## 1. Introdução

O cultivo de peixes tem crescido anualmente no mundo todo, aumentando a demanda por tecnologias que suportem o rápido crescimento das espécies de peixes. Em resposta às demandas de mercado, o sistema de produção intensivo tem sido utilizado pelas grandes piscigranjas. Apesar da maior produtividade deste sistema de produção, perdas econômicas significativas têm sido observadas durante o processo produtivo devido à baixa resistência dos animais a fatores estressores, nos quais seus efeitos são exacerbados devido a características peculiares deste sistema. Desta forma, pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de mitigar ou reduzir os efeitos deletérios destes fatores estressores e melhorar a resistência dos peixes utilizando diversas estratégias nutricionais. Entre elas destacam-se a suplementação de níveis de vitaminas acima da exigência e a utilização de imunomoduladores na dieta (Blazer, 1992; Cuesta et al., 2002; Barros et al., 2006).

As vitaminas além de possuírem funções específicas no organismo e em alguns casos serem responsáveis pela regulação do crescimento, estão envolvidas ainda com a manutenção do sistema imune e resistência à doenças e agentes estressores. Entre as vitaminas em que há vasta literatura sobre seus efeitos sobre a resistência à infecções e estresse em peixes, destacam-se a vitamina C e E (Blazer, 1992). Entretanto, outras vitaminas possuem, da mesma forma, ação benéfica sobre o sistema imune, promovendo maior resistência à doenças quando incorporadas em níveis superiores a exigência.

Os compostos com atividade em vitamina A, também conhecidos como retinóides, estão envolvidos em diversos aspectos dos processos fisiológicos nos animais. Entre eles, ressaltam-se a manutenção e desenvolvimento das células epiteliais, desenvolvimento ósseo, reprodução e visão (Kaneko, 1997; Devlin, 1998). Devido a este fato, esta vitamina é considerada nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento normal do organismo.

Além destas funções, diversos estudos têm indicado sua provável ação sobre a manutenção do sistema imune. Estudos conduzidos com animais terrestres demonstraram que esta vitamina promove melhora na resposta imune celular e humoral levando à maior susceptibilidade aos agentes infecciosos quando em casos de

deficiência (Cuesta et al., 2002). Em peixes, a quantidade de estudos com relação à vitA ainda é incipiente e os resultados contraditórios. Entretanto, alguns estudos têm indicado aumento da resistência à doenças e possível efeito imunestimulante de compostos retinóides biologicamente ativos (Evans et al., 1984; Thompson et al., 1994; Cuesta et al., 2002). Deve-se ressaltar ainda o envolvimento desta vitamina no metabolismo do ferro e, concomitantemente, sua relação com o sistema hematopoiético (Roodenburg et al. 1994, 1996, Strube et al. 2002).

Apesar da tilápia ser amplamente cultivada em todo o mundo e da sua grande importância econômica, principalmente para os países em desenvolvimento, não há estudos relativos aos efeitos fisiológicos da vitamina A sobre os parâmetros de saúde desta espécie. Com base no exposto, esta pesquisa objetivou avaliar o efeito fisiológico da adição de níveis crescentes de vitamina A sobre os parâmetros imunológicos e hematológicos de tilápias do Nilo submetidas ao estímulo pelo frio e desafiadas experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Dietas*

Uma dieta basal (Tabela 1) foi confeccionada utilizando ingredientes convencionais. As dietas foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais da tilápia do Nilo (NRC 1993). O suplemento vitamínico e mineral adicionado era isento de vitamina A. A fonte de vitamina A utilizada foi o acetato de retinila com 1.000.000 UI g<sup>-1</sup> do produto (Rovimix<sup>®</sup> A 1000). A fonte de vitamina A foi diluída em amido de forma a facilitar na mistura das dietas e incorporadas em substituição à quantidades equivalentes de quirera de arroz para obter os seguintes níveis: 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 e 12800 UI kg<sup>-1</sup>. Uma dieta ausente de vitamina A foi utilizada como controle negativo.

Todos os ingredientes foram moídos até apresentarem-se com diâmetro inferior a 500 µm. As dietas foram mecanicamente homogeneizadas e água foi adicionada a 25% do peso seco em misturador automático (Ação Científica) e extrusada à 99-120 °C em extrusora laboratorial de rosca simples (Extrutech) de forma a obter pelétes de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro. As dietas foram secas e armazenadas em freezer

à -18 °C até a utilização. No início do período experimental as dietas foram quebradas e classificadas em peneiras com diâmetro entre malhas condizente com o tamanho dos peixes.

## *2.2 Peixes e procedimento experimental*

Alevinos revertidos para macho de tilápia do Nilo foram adquiridos de piscicultura comercial (Santo Antonio do Aracanguá, SP, Brasil) e aclimatizados às condições laboratoriais em quatro aquários de 250L. Os peixes foram alimentados com a dieta basal (sem suplementação de vitamina A) durante 15 dias antes do início do experimento com o objetivo de depletar as reservas de vitamina A.

O experimento teve a duração de 130 dias. Inicialmente, 320 alevinos de tilápia do Nilo com peso médio inicial de  $7,49 \pm 0,19\text{g}$  foram aleatoriamente distribuídos em 40 aquários de 250L. Os aquários encontravam-se conectados a um sistema de recirculação fechada de água com dois filtros biológicos com a finalidade de remover fezes dos peixes e reduzir a concentração de amônia. A vazão média nos aquários era de  $6,59 \text{ L min}^{-1}$ . A temperatura da água foi controlada por meio de termostato digital e mantida em  $26,0 \pm 0,7 \text{ °C}$ . As medidas de oxigênio dissolvido e da temperatura da água foram realizadas semanalmente em quatro aquários selecionados aleatoriamente; as fezes acumuladas foram removidas por sifonamento.

Cada dieta foi distribuída aleatoriamente em cinco aquários. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente. A frequência alimentar utilizada foi de quatro vezes ao dia sendo as dietas ofertadas às 0800, 1100, 1400 e 1700 h. Durante o período experimental os parâmetros de qualidade da água foram mantidos na faixa ideal para o cultivo de tilápias (pH  $7,0 \pm 0,5$ ; oxigênio dissolvido  $6,2 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ; e amônia ( $\text{NH}_3$ )  $147,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ). Todos os aquários foram mantidos sob fotoperíodo natural.

Ao final do período experimental, os peixes permaneceram em jejum por 12 horas e procederam-se as análises hematológicas e imunológicas descritas posteriormente.

## *2.3 Análise hematológica*

Para avaliação dos parâmetros hematológicos, cinco peixes por tratamento foram aleatoriamente capturados após 130 dias de alimentação com as dietas contendo níveis crescentes de vitamina A, correspondendo ao período anterior ao estímulo pelo frio. Os peixes foram anestesiados por imersão em solução alcoólica de benzocaína à  $67 \text{ mg L}^{-1}$  e após completa insensibilização o sangue foi coletado por punção do vaso caudal utilizando seringa de 1,0 mL banhadas com anticoagulante (EDTA a 3,0%). A contagem de eritrócitos e leucócitos totais foi realizada pelo método do hemocitômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se o azul de toluidina a 0,01% em pipeta de Thoma como solução diluente e corante. A diferenciação dos leucócitos foi realizada em extensão do sangue em lâminas e coradas com o corante hematológico May-Grünwald-Giemsa-Wright de acordo com a técnica descrita por Tavares-Dias & Moraes (2003). A contagem diferencial foi realizada em microscópio óptico utilizando lente com aumento de 100X em óleo de imersão. Para estabelecer as porcentagens de cada tipo celular de interesse duzentas células foram contadas por todo o campo da extensão.

A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método colorimétrico da cianometahemoglobina utilizando kit comercial (Analisa Diagnóstica<sup>®</sup>) de acordo com Collier (1944). A porcentagem de hematócrito (Htc) foi determinada pelo método do microhematócrito descrito por Goldenfarb et al. (1971). A proteína plasmática total (PPT) foi determinada em refratômetro manual Goldberg utilizando o plasma contido no capilar para microhematócrito após leitura do hematócrito (Feldman et al. 2000). A análise do teor de albumina do plasma foi realizada com base no método colorimétrico do verde de bromocresol utilizando kit comercial (Labtest<sup>®</sup>). A fração globulina do plasma foi determinada pela diferença entre a PPT e a albumina, enquanto a relação A:G foi calculada dividindo-se o valor de albumina pelo valor de globulina.

O volume corpuscular médio [ $\text{VCM} = (\text{Htc} \times 10) / \text{eritrócitos}$ ] e a concentração de hemoglobina corpuscular média [ $\text{CHCM} = (\text{Hb} \times \text{Htc}) \times 100$ ] foram calculados de acordo com Wintrobe (1933) permitindo classificar possível anemia.

#### 2.4 Atividade do *burst* respiratório de monócitos

A atividade do *burst* respiratório foi medida por meio da produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e do nitrogênio (ERN) em cultura de monócitos conforme metodologia adaptada de Secombes (1990). Uma suspensão de leucócitos foi preparada

a partir do sangue após formação de monocamada sobre gradiente de Percoll 51,0%/34,0% e centrifugado a 1400 rpm por 20 min. A monocamada de leucócitos foi removida e lavada duas vezes em meio L-15 e após resuspensão a concentração celular foi ajustada para  $2,0 \times 10^6$  células/mL. Cem  $\mu$ L de alíquotas de células foram adicionadas à placas de well e incubadas durante uma hora a 18 °C com meio L-15 contendo 0,1% de soro bovino fetal (BSF). As células não aderentes foram lavadas em meio L-15 e, posteriormente, adicionou-se meio L-15 contendo 2,0% de BSF. Após incubação por 16 horas a 18 °C o sobrenadante foi retirado para dosagem de óxido nítrico (NO) e a dosagem do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi realizada com a monocamada. PMA (phorbil myristate acetate) foi adicionado como controle positivo em parte dos poços para determinar a responsividade da monocamada de monócitos.

A concentração de NO no sobrenadante foi determinada por meio da reação de Griess (Green et al., 1982). Foi utilizado como curva-padrão diferentes concentrações da solução de  $NaNO_2$ . Os valores foram expressos em  $\mu$ mol/ $10^5$  células. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro para múltiplas leituras em filtro de 540 nm.

A concentração de  $H_2O_2$  nas células foi quantificada pelo método colorimétrico da oxidação de vermelho de fenol (Pick & Keisari, 1980). Foi utilizado como curva-padrão diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . Os valores foram expressos em nmol/ $10^5$  células. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro para múltiplas leituras em filtro de 620 nm.

### *2.5 Estímulo pelo frio*

Após a avaliação hematológica o restante dos peixes permaneceu no sistema experimental (40 aquários) com o sistema de aquecimento desligado de forma a reduzir gradativamente a temperatura para posterior transferência para a sala de desafio. Os peixes foram transferidos quando a temperatura de ambos os sistemas se apresentou semelhante. A sala experimental de desafio possuía 16 aquários com capacidade para 40 L de água com filtro interno e aeração constante, assim como o sistema de refrigeração da temperatura ambiente que conseqüentemente reduz a temperatura da água. Trinta e dois peixes foram aleatoriamente distribuídos nos aquários experimentais. O delineamento experimental foi o mesmo utilizado no período pré-experimental sendo quatro repetições por tratamento.

No momento da transferência dos peixes a temperatura da água era de 23,4 °C e foi reduzida gradativamente até atingir a temperatura de 16 °C. Ao final dos cinco dias de desafio térmico os mesmos parâmetros hematológicos e a atividade do *burst* respiratório foram avaliados como descritos anteriormente.

## 2.6 Desafio com *A. hydrophila*

Cepas virulentas de *A. hydrophila* adquiridas do laboratório de patologia de organismos aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp foram cultivadas em meio de cultura BHI por 24 horas e utilizadas para o desafio bacteriano.

Após o período de avaliação pré-experimental, 52 peixes foram transferidos para a sala experimental de desafio contendo 26 aquários de 40 litros cada (com filtros, aquecedores e aeração individualizados), na densidade de dois peixes por aquário. Devido ao reduzido número de peixes do tratamento que continha 1.600 UI de vit.A/kg da dieta, o número de repetições foi menor em comparação aos demais peixes dos tratamentos que foram submetidos ao estímulo pelo frio. Foi mantido o mesmo delineamento experimental utilizado no período pré-experimental.

Devido à alta mortalidade causada pela deficiência de vitamina A não foi possível determinar a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e do nitrogênio (ERN) nos peixes dos tratamentos 0, 200, 400 visto o número insuficiente de animais. Estes tratamentos, juntamente com o tratamento suplementado com 800 UI de vitA/kg, não puderam ser submetidos aos desafios devido à ausência de animais.

Para determinação da concentração celular ideal a ser utilizada no desafio experimental, quatro grupos de 25 peixes foram infectados com diferentes concentrações da bactéria visando a determinação da concentração celular letal de 50,0% dos peixes testados (CL50), de acordo com metodologia proposta por Plumb & Bowser (1983). Essa avaliação foi efetuada 20 dias antes da finalização do período pré-experimental. Após a finalização do período pré-experimental e estímulo pelo frio, 52 peixes foram infectados com injeção intraperitoneal contendo  $2,0 \times 10^6$  células/mL de *A. hydrophila*, concentração esta determinada no CL50, e 0,04 mL de dexametasona. A avaliação da possível mortalidade foi efetuada duas vezes ao dia, juntamente com a alimentação dos animais. Ao final desse período foi calculada a mortalidade cumulativa, taxa de sobrevivência (Plumb & Bowser) e o estado de ativação dos monócitos.



### *Procedimento analítico e análise de vitamina A*

O conteúdo de proteína bruta, umidade, lipídeos e cinzas das dietas foram determinados de acordo com os protocolos da AOAC (AOAC 1995). A determinação da vitamina A nas dietas foi realizada de acordo com Nöll (1996) e Bankson et al. (1986). A técnica utilizada foi análise de vitamina A realizada por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC. Inicialmente, as amostras foram convertidas em retinol por meio de hidrólise alcalina e após este processo foram extraídas em solvente apropriado e então diluições sucessivas foram realizadas para serem aplicadas à cromatografia e quantificadas com padrão externo.

### *2.7 Análise estatística*

Os resultados desse estudo foram avaliados por meio da técnica da análise de variância e quando significativo, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de médias de Tukey (Stell & Torrie, 1984), e complementado com a análise de perfil, para comparação dos momentos anterior e posterior aos desafios. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do pacote computacional SAS (SAS 8.12).

## **3. Resultados**

### *3.1 Parâmetros hematológicos*

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios do número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de tilápias alimentadas com diferentes níveis de vitamina A e submetidas ao estímulo pelo frio. Pode-se observar que a suplementação de vitamina A às dietas promoveu melhora nos parâmetros hematológicos. Entretanto, os peixes dos tratamentos 0, 200, 400, 800 e 1.600 UI de vitA apresentaram número de eritrócito estatisticamente semelhante, enquanto os peixes do tratamento suplementado com 12.800 apresentaram o maior valor de eritrócitos, não diferindo dos peixes do tratamento suplementado com 6.400 UI/kg. Após o estímulo pelo frio, os animais dos tratamentos 6.400 e 12.800 apresentaram maior número de

eritrócitos, não diferindo do grupo cujas dietas foram suplementadas com 3.200 UI de vitA/kg.

A porcentagem de hematócrito dos peixes alimentados com níveis iguais ou superiores a 1.600 UI de vitA/kg foi superior aos alimentados com os demais níveis estudados. Apesar dos peixes do tratamento com 6.400 UI de suplementação terem apresentado o maior valor de hematócrito após estímulo pelo frio, este diferiu apenas dos peixes do tratamento suplementado com 1.600 UI. A taxa de hemoglobina apresentou o mesmo comportamento descrito para a porcentagem de hematócrito antes e após estímulo pelo frio, enquanto não se observou diferença entre tratamentos para a CHCM.

No momento anterior ao estímulo pelo frio o VCM foi diferente apenas nos peixes alimentados com 1.600 UI quando comparado com os peixes alimentados com 200 e 800 UI/kg. Após o desafio, apenas os peixes dos tratamentos suplementados com 6.400 e 12.800 UI/kg apresentaram diferentes valores para o VCM ( $P<0,05$ ).

Diferenças entre os momentos antes e após estímulo pelo frio foram observadas para a porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina e VCM dos peixes alimentados com as dietas suplementadas com 1.600 e 12.800 UI de vitA/kg.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios do número de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos de tilápias alimentadas com diferentes níveis de vitamina A e submetidas ao estímulo pelo frio. Os peixes dos tratamentos 1.600 e 6.400 na fase anterior ao estímulo pelo frio apresentaram o maior número de leucócitos. Entretanto, estes valores diferiram apenas nos peixes dos tratamentos que continham 200 e 800 UI/kg. Não foi observado efeito significativo da suplementação de vitamina A sobre a diferenciação dos leucócitos antes do estímulo pelo frio. Entretanto, maior número de monócitos foi observado nos peixes arraçados com a dieta contendo 1.600 UI, diferindo apenas dos peixes do tratamento suplementado com 6.400 UI. Efeito do estímulo pelo frio sobre o diferencial de leucócitos foi observado apenas para o número de linfócitos e neutrófilos.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios da proteína plasmática total (PPT), globulinas, relação A:G e albumina (ALB) de tilápias alimentadas com diferentes níveis de vitamina A e submetidas a estímulo pelo frio. Foi observado efeito quadrático da adição de vitamina A sobre a PPT e sobre a fração globulina do plasma

antes e após estímulo pelo frio. Entretanto, este efeito foi observado apenas para o momento antes do desafio na relação A:G. Após o desafio, os peixes do tratamento 3.200 UI de vitA/kg apresentaram maior relação A:G ( $P<0,05$ ). O nível de suplementação de 3.200 UI de vitA promoveu o menor valor de ALB no plasma. Entretanto, após estímulo pelo frio os peixes alimentados com a dieta suplementada com este nível apresentaram os maiores valores, não diferindo apenas dos peixes do tratamento 6.400 UI de vitA/kg. O nível de 1.600 UI promoveu o valor mais baixo de ALB no plasma. De maneira geral, o estímulo pelo frio influenciou os valores e perfil das proteínas plasmáticas, com exceção do nível de 1.600 UI de vitA para a fração globulina, dos níveis 6.400 e 12.800 para a relação A:G, e do nível 3.200 UI para a ALB ( $P<0,05$ ). Os níveis de vitamina A estimados que promoveram a obtenção de maiores valores para PPT, globulinas e relação A:G foram, respectivamente, 4.072; 4.030 e 4.138 UI/kg da dieta.

### 3.2 Atividade do burst respiratório de monócitos

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios da produção de  $H_2O_2$  e NO por monócitos de tilápias alimentadas com níveis crescentes de vitamina A e submetidas a estímulo pelo frio e desafiadas experimentalmente com *A. hydrophila*. A produção de ERO ( $H_2O_2$ ) e ERN (NO) foi afetada significativamente pela adição de vitA às dietas. A produção de  $H_2O_2$  foi menor nos níveis de 6.400 e 12.800 UI de vitA/kg da dieta, porém diferiram apenas dos peixes do tratamento suplementado com o nível de 3.200 UI. Por outro lado, não foram observadas diferenças entre os níveis estudados quando os animais foram submetidos a estímulo pelo frio. Para a produção de NO, o nível de 800 UI promoveu a maior produção de NO, não diferindo apenas do tratamento com 3.200 UI de vitA/kg da dieta. Após estímulo pelo frio o nível de 3.200 UI de vitA promoveu a maior produção de NO pelos monócitos.

A produção de  $H_2O_2$  foi influenciada ( $P<0,05$ ) pelo estímulo a frio apenas nos níveis de 800 e 3.200 UI de vitA/kg da dieta, enquanto a produção de NO foi afetada ( $P<0,05$ ) nos níveis de 800, 1.600 e 12.800 UI.

Após infecção experimental com *A. hydrophila* os peixes alimentados com a ração suplementada com 6.400 apresentaram a maior produção de NO e  $H_2O_2$ , enquanto os peixes da suplementação de 1.600 e 12.800 UI tiveram a menor produção de ERO e

ERN, respectivamente. Devido à reduzida quantidade de indivíduos após o desafio experimental com *A. hydrophila* não foi possível realizar as análises estatísticas. Desta forma, apenas descrição dos resultados foi apresentada.

### 3.3 Desafio com *A. hydrophila*

Durante o período de infecção experimental a maior sobrevivência foi observada nos peixes alimentados com 1.600 UI de vitA/kg da dieta, enquanto o nível de 6.400 proporcionou a menor sobrevivência. A maior mortalidade nos grupos alimentados com as dietas contendo 6.400 e 12.800 UI aconteceu entre o sétimo e décimo dia do desafio experimental, enquanto que os demais níveis tiveram suas mortalidades distribuídas durante todo o período do desafio. Apesar de não ter sido observado diferença significativa entre os tratamentos, o número de dias observados para a primeira mortalidade foi maior nos peixes suplementados com 12.800 UI de vitA/kg da dieta.

## 4. Discussão

O conteúdo de vitamina A determinado na análise das rações foi, de maneira geral, metade da quantidade adicionada às dietas (Tabela 1). Não foi possível detectar esta vitamina nos tratamentos 0, 200, 400 e 800 UI kg<sup>-1</sup> da dieta. Apesar da fonte de vitamina utilizada neste estudo apresentar alta estabilidade ao processo de extrusão (acima de 90%), dados técnicos têm demonstrado que a maioria das fontes de vitamina A presentes no mercado apresenta 77% de retenção após o processo de extrusão (BASF, 2001). Entretanto, Barrows et al. (2008) observaram diferentes valores de retenção para a vitamina A, ácido fólico e tiamina em dietas extrusadas para a truta arco-íris. Estes autores obtiveram taxas de retenção para vitamina A variando de 11 à 59%, enquanto a literatura tem descrito valores de retenção da ordem de 87% (Gadiant e Fenster 1994).

A extrusão é um método de processamento da dieta extremamente agressivo que tem demonstrado causar destruição significativa das vitaminas em suplementos (Anderson e Sunderland 2002) e ingredientes (Athar et al. 2006). Este fator associado ao período de armazenamento da dieta devem ter influenciado para o menor conteúdo determinado desta vitamina. Visto a totalidade dos estudos serem conduzidos utilizando dietas peletizadas, torna-se difícil a comparação.

Estudos antigos sobre a exigência nutricional de peixes baseavam-se estritamente em parâmetros de desempenho. Entretanto, deve-se destacar às complexas interações entre nutrientes, aos efeitos fisiológicos, a susceptibilidade à doenças e estado geral de saúde dos peixes (Blazer, 1992).

A hematologia tem sido ferramenta utilizada para descrever o estado fisiológico frente à utilização de substâncias tóxicas, a variabilidade genética e o estresse (Svobodová e Vysuková, 1991). Além destes fatores que podem afetar a homeostase do animal, a nutrição e seus efeitos sobre os parâmetros hematológicos têm sido pesquisadas atualmente com a finalidade de combater os efeitos depressores do estresse no cultivo de peixes. Entretanto, o volume de trabalhos ainda é modesto (Barros et al., 2006; Ranzani-Paiva, 2007).

Até o presente momento, apenas dois estudos encontram-se na literatura relatando o efeito da vitamina A sobre os parâmetros hematológicos em peixes, entretanto nenhum com a tilápia do Nilo. Estudo com salmonídeos demonstraram sinais clínicos de hipervitaminose A, contudo a utilização de megadoses de vitA não influenciou os parâmetros hematológicos (Hilton, 1983), enquanto *Heteropneustes fossilis* alimentados com dietas deficientes em vitA apresentaram queda nos parâmetros hematológicos (Goswami e Dutta, 1991). Por outro lado, os sinais clínicos de hipo e hipervitaminose A em mamíferos são bem descritos e mais consistentes.

Os valores do número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e hemoglobina dos peixes alimentados com as dietas contendo de 3.200 a 12.800 UI de vitA/kg da dieta estão dentro do intervalo de referência publicado para a tilápia (Hrubec et al., 2000; Feldman et al., 2000; Barros et al., 2009). Entretanto, o número de eritrócitos observado nos animais alimentados com 6.400 e 12.800 UI de vitA se encontraram superiores aos valores médios determinados nas mesmas condições experimentais (Barros et al., 2009). Os valores observados para os animais dos demais tratamentos encontram-se todos abaixo do intervalo de referência publicado pela literatura para tilápia.

No presente estudo a ausência de vitA e a suplementação até o nível de 800 UI promoveu reduzidos valores de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos. O nível de 12.800 UI promoveu a maior produção de células vermelhas, entretanto esta não foi diferente do nível de 6.400. Resultados similares foram obtidos com o *H. fossilis* alimentados com uma dieta controle e outra deficiente em vitA, no qual os animais

apresentaram reduzida taxa de hemoglobina e do número de eritrócitos (Goswami e Dutta, 1991).

Redução da função hematopoiética pode ser observada em estágios iniciais de deficiência de vitA em mamíferos, entretanto no estágio em que os animais encontram-se severamente deficientes os índices para identificar anemia encontram-se normais (Mejia et al., 1979). A anemia ocasionada pela deficiência de vitA, nos primeiros estágios, parece estar relacionada com o prejuízo no metabolismo do ferro. Em animais deficientes, tem se observado aumento na absorção de Fe, e na deposição deste nos tecidos (fígado), entretanto com redução da concentração de Fe no plasma, indicando que o ferro encontra-se retido nos estoques corporais tornando-se indisponível para os demais tecidos (Mejia et al., 1979; Roodenburg et al., 1994; Roodenburg et al., 1996; Strube et al., 2002).

De maneira geral, não foi observado efeito significativo sobre os índices hematimétricos, VCM e CHCM, utilizados normalmente para classificar as anemias. Desta forma, o mecanismo de ação da vitA sobre o desenvolvimento de anemia em peixes pode ser semelhante daquele que ocorre em mamíferos visto os sinais de deficiência de vitA, no momento da avaliação hematológica, terem sido severos. Hilton (1983) observou redução linear da concentração de Fe no fígado de trutas arco-íris com o aumento do nível de vitA nas dietas, indicando efeito similar ao que ocorre em mamíferos. Entretanto, mais estudos são necessários de forma a determinar o mecanismo preciso de ação deste nutriente sobre o sistema hematopoiético.

Apenas os peixes alimentados com 200 e 800 UI de vitA diferiram do grupo alimentado com 1.600 UI para o VCM, porém isto pode ser devido a fatores extrínsecos como o estresse no momento da captura do animal. Em situações de estresse, os peixes realizam contração esplênica com a finalidade de liberar mais células vermelhas que possam oxigenar melhor os tecidos no momento da fuga. Entretanto, grande quantidade de células imaturas é liberada, as quais apresentam maior tamanho e, conseqüentemente, alto VCM (Kaneko, 1997; Ellsaesser e Clem, 1986, 1987).

A diferença observada no número de eritrócitos entre os peixes alimentados com os diferentes níveis pode residir na atividade mitogênica dos compostos de vitA biologicamente ativos (retinol, retinal e ácido retinóico), pois estes compostos estão envolvidos no processo de diferenciação e divisão celular. Zile et al. (1979) enfatizaram

que os efeitos da vitA na estimulação do crescimento residem, principalmente, em sua função na replicação e na estimulação da diferenciação celular.

De modo geral, o estímulo pelo frio não influenciou o número de eritrócitos e o CHCM dos peixes frente aos diferentes tratamentos, apesar de ter havido redução em todos os valores após o estresse. Os peixes alimentados com as dietas contendo 1.600 e 12.800 UI de vitA/kg apresentaram redução significativa do hematócrito, taxa de hemoglobina e VCM no estímulo pelo frio, indicando que estes animais não foram capazes de manter os parâmetros hematológicos normais numa situação de estresse. Pode-se inferir que no nível de 12.800 UI um processo de hipervitaminose moderada tenha sido iniciado, visto os reduzidos valores observados, enquanto o nível de 1.600 UI pode estar relacionado a possível deficiência marginal de vitA. A literatura relata indícios de problemas metabólicos em tilápias alimentadas com 10.000 UI de vitA/kg da dieta (Saleh et al., 1995).

Apenas os valores apresentados para os peixes alimentados com 200 e 800 UI diferiram do grupo alimentado com 1.600 e 6.400 UI para o número total de leucócitos, apresentando estes últimos os maiores valores. Entretanto, não foi observado efeito dos níveis de vitA na diferenciação. Apesar do número de neutrófilos e monócitos não terem sido estatisticamente diferentes há tendência para o aumento de neutrófilos em níveis de vitA acima de 1.600 UI em comparação aos níveis em que os peixes apresentaram sintomas de deficiência severa desta vitamina, enquanto os monócitos apresentaram tendência de maiores valores nos animais alimentados com os níveis mais baixos de vitA (0 a 800 UI/kg da dieta). Esses resultados são contrários aos obtidos por Goswami e Dutta (1991) com o *H. fossilis*. Estes autores relataram maior porcentagem de neutrófilos, basófilos e eosinófilos e reduzida porcentagem de linfócitos e monócitos em peixes deficientes em vitA.

Tem sido relatado alta correlação entre a deficiência de vitA e a susceptibilidade à doenças, sendo esta vitamina considerada agente anti-infectivo em humanos (Bendich e Langseth, 1989; Wiedermann et al., 1996; Stephensen, 2001; Cuesta et al., 2002). Desta forma, pode-se inferir que o maior número de monócitos pode estar relacionado com possível infecção por agentes patogênicos ocasionada pela maior susceptibilidade dos peixes deficientes em vitA, visto este tipo de célula fagocítica ser a segunda linha de defesa do sistema imune inespecífico no processo de controle da infecção.

Aumento significativo no número de neutrófilos foi observado após estímulo pelo frio. O nível de 1.600 UI promoveu aumento de 71,0% no número de neutrófilos após estímulo pelo frio, enquanto a porcentagem de linfócitos dos peixes foi reduzida. Entretanto, a menor porcentagem de queda foi observada no nível de 6.400 UI. Estudos com a tilápia têm relatado incrementos superiores ao desta pesquisa em todos os tipos celulares após estímulo pelo frio, entretanto estes estudos utilizaram temperaturas menores (Falcon et al., 2008; Signor, 2007).

A queda no número de leucócitos e linfócitos, denominada leucopenia e linfocitopenia, respectivamente, são efeitos do estresse descrito por vários autores (Barton e Iwana, 1991; Falcon et al, 2008; Signor, 2007). Apesar de não significativa, os dados demonstram forte tendência a redução no número de leucócitos totais corroborando com os resultados descritos pela literatura. Este efeito depressor do estresse reside, principalmente, na ação do cortisol sobre o sistema imune. O mecanismo pelo qual o cortisol afeta a proliferação de leucócitos está relacionado com sua capacidade de induzir a apoptose celular (Weyts et al., 1997), reduzindo assim o número de células de defesa do organismo, como observado no presente estudo.

A proteína plasmática total refere-se à fração albumina e globulina presente no plasma ou soro sanguíneo. Estas duas classes de proteínas do soro são produzidas no fígado, sendo a primeira, a fração mais abundante e responsável pelo transporte de nutrientes e manutenção do equilíbrio osmótico do sangue, enquanto a fração globulina está envolvida nos mecanismos de defesa do animal (Thomas, 2000). A RBP é uma proteína transportadora sintetizada no fígado que, juntamente com a transtirretina do plasma, são responsáveis pelo transporte do retinol no sangue para os tecidos-alvos. Desta forma, o aumento nos valores de PPT com o acréscimo do nível de vitamina A está relacionado com o aumento na concentração de globulinas e à manutenção dos valores de albumina, com exceção do tratamento com 3200 UI. Este efeito pode ser explicado pela necessidade do organismo em produzir maior quantidade de transtirretina para transportar o retinol no plasma chegando ao ponto de saturação (4.030 UI de vit.A). Níveis excedentes podem ter causado distúrbios metabólicos com conseqüente redução nos valores de globulina e PPT, ressaltando um possível efeito tóxico. Entretanto, seria necessário a separação por eletroforese destas proteínas que compõem a fração globulina ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -globulinas) de forma a esclarecer qual o tipo de globulina



que está sendo produzida, visto a transtirretina fazer parte do grupo das  $\alpha$ -globulinas. Estes resultados são semelhantes àqueles obtidos por Saleh et al. (1995) que observaram sinais de problemas metabólicos em tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com 10.000 UI de vit.A/kg da dieta.

O mesmo comportamento pode ser observado para o perfil de proteínas do plasma após estímulo pelo frio com exceção da relação A:G. O estresse reduziu, de forma significativa, o nível de proteínas plasmáticas. Apenas o nível de 1.600 UI proporcionou aumento na concentração de globulinas após estímulo pelo frio. Thomas (2000) enfatizou que em infecções há aumento na produção de globulinas. Desta forma, pode-se inferir que os peixes alimentados com a dieta suplementada com 1.600 UI poderiam apresentar infecção por patógenos oportunistas visto a maior susceptibilidade ao estresse. Entretanto, os menores valores observados para os demais tratamentos podem estar relacionados com o mecanismo fisiológico do peixe em se adaptar às condições de baixa temperatura, reduzindo seu metabolismo.

Os peixes alimentados com as dietas suplementadas com 6.400 e 12.800 UI de vit.A/kg apresentaram os menores valores de produção de  $H_2O_2$ . Entretanto, para o NO os menores valores foram apresentados pelo nível de 6.400, 12.800 e 1.600 sendo que os peixes que tiveram maior produção desta ERN foram àqueles alimentados com as dietas contendo 800 e 3.200 UI de vit. A/kg. Isto pode indicar que o nível de suplementação de 6.400 UI de vit. A seja o ideal para a manutenção da integridade das barreiras físicas envolvidas no mecanismo de defesa do animal não permitindo que patógenos oportunistas ativem mecanismos celulares do sistema imunológico. Por outro lado, Thompson et al. (1994) não observaram efeito significativo sobre a atividade do *burst* respiratório de macrófagos renais de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentados com dietas contendo níveis abaixo (1.075 UI/kg), normal (5.670 UI/kg) e acima (43.605 UI/kg) da exigência de vitamina A. Entretanto, estes autores mensuraram outros produtos decorrentes da ativação dos macrófagos, fato este que dificulta a comparação dos resultados (Blazer, 1992). Apesar dos resultados contrários, estes autores observaram maior resistência dos animais alimentados com acetato de retinol que àqueles alimentados com quantidade reduzida de retinol. Diferentemente, estudos realizados com o *seabream* (*Sparus aurata*) relataram aumento da atividade do *burst*

respiratório e da mieloperoxidase em leucócitos, assim como da atividade citotóxica de leucócitos isolados do rim cefálico (Cuesta et al. 2002, 2003).

Após o desafio experimental com *A. hydrophila*, a maior produção de ERO e ERN foi observada nos peixes alimentados com 6.400 UI de vitA. Entretanto, pela alta mortalidade dos peixes após desafio, estes resultados são apenas descritivos. A reduzida produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO pelos peixes alimentados com 12.800 UI reforçam os resultados descritos anteriormente para os parâmetros hematológicos e o perfil de proteínas plasmáticas que indicam possível efeito tóxico deste nível.

A adição de PMA, agente mitogênico utilizado para ativar experimentalmente células do sistema imune, apenas ativou os monócitos dos peixes alimentados com 6.400 e 12.800 UI de vitA, indicando que as células apresentavam-se responsivas. Estes achados indicam que na deficiência de vitA a população de monócitos encontra-se em maior quantidade, entretanto menos responsivo (Stephensen, 2001). O estímulo pelo frio reduziu, de modo geral, a produção de ERO e ERN, entretanto o nível de 6.400 UI proporcionou maior resistência dos peixes frente ao estresse.

Em mamíferos a deficiência de vitamina A pode ocasionar aumento do número de neutrófilos com reduzida atividade, redução da capacidade fagocítica e metabólica oxidativa de macrófagos com conseqüente diminuição da habilidade em ingerir e eliminar bactérias (Stephensen, 2001). Entretanto, os resultados sobre o efeito da vitamina A nas respostas imunológicas e na saúde dos peixes são, ainda, inconclusivos.

De maneira geral, a mortalidade foi alta durante o período de infecção experimental com *A. hydrophila*. Os dados não se encontram condizentes com àqueles observados para os demais resultados. Isto pode ser devido ao diferente número de peixes de cada tratamento que foram desafiados e ainda algum fator que não pôde ser controlado durante o desafio experimental.

A vitamina A influencia a atividade do *burst* respiratório de monócitos de tilápias do Nilo e com base no perfil de proteínas plasmáticas pode-se estimar que o nível de 4.138 UI de vit. A/kg de ração proporciona melhor condição de saúde. Sinais clínicos de deficiência em vitA em tilápias do Nilo incluem neutropenia, redução do número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina.

## 5. Referências

- Anderson, J.S., Sunderland, R., 2002. Effect of extruder temperature and dryer processing temperature on vitamin C and E and astaxanthin stability. *Aquaculture* 207, 137–149.
- AOAC. Official Methods of Analysis (16th Ed.), 1995. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Athar, N., Hardacre, A., Taylor, G., Clark, S., Harding, R., McLaughlin, J., 2006. Vitamin retention in extruded food products. *J. Food Comp. Anal.* 19, 379–383.
- Bankson, D.D.; Russell, R.M. & Sadowski, J.A., 1986. Determination of retinyl esters and retinol in serum or plasma by normal phase liquid chromatography: method and applications. *Clin. Chem.*, v. 32, p. 35-40.
- Barros, M.M., Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães, I.G., 2006. Nutrição e saúde de peixes. Pages 1-15 *in* II Colégio Latino-Americano de Nutrição Animal. Palestra técnica em Manejo e Nutrição de Organismos Aquáticos. April 10-13, 2006, São Paulo, Brazil.
- Barros, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães, I.G., 2009. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. *Aquac. Res.* DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02175.x.
- Barrows, F.T., Gaylord, G.T., Sealey, W.M., Porter, L., Smith, C.E., 2008. The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 283, 148-155.
- Barton, B.B.; Iwana, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1:3- 26.
- Basf, 2001. Vitamin stability in premixes and feeds: a practical approach. 6<sup>a</sup> ed., 24p.
- Bendich, A., Langseth, L., 1989. Safety of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 358-371.
- Blazer, V.S., 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Disease* 1, p. 309-323.

- Collier, H.B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. Canadian Medical Assistance Journal 50: 550-552.
- Cuesta A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. Tumouricidal activity of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.) natural cytotoxic cells: the role played in vitro and in vivo by retinol acetate. Fish Shellf. Immunol.14, 133-144.
- Cuesta A., Ortuño, J., Rodrigues, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002. Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. Fish Shellf. Immunol. 13, 279-291.
- Devlin, T. M., 1998 *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. Edgard Blücher, São Paulo, Brazil.
- Ellsaesser CF, Clem LW., 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. J. Fish Biol. 28, 511-521.
- Ellsaesser CF, Clem LW., 1987. Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Comp Biochem Physiol A Comp Physiol. 87, 405-408.
- Evans, D.L., Graves, S.S., Blazer, V.S., Dawe, D.L., Gratzek, J.B., 1984. Immunoregulation of fish non-specific cytotoxic cell activity by retinol acetate but not poly I:C. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 7, 91-100.
- Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Solarte, W.V.N., Guimarães, I.G., 2008. Differential leukocyte counts of Nile tilapia fed diets supplemented with vitamin C and lipid and submitted to low temperature stress. Cienc. Anim. Bras. 9 (3),543-551.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5.ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Gadient, M., Fenster, R., 1994. Stability of ascorbic acid and other vitamins in extruded feeds. Aquaculture 124, 207-211.
- Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F. P.; Hall, E. and Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. American Journal Clinic Pathology 56(1):35-39.
- Goswami, U.C., Dutta, N.K., 1991. Vitamin A-deficient diet and its effects on certain haematological parameters of *Heteropneustes fossilis* a 3-4-dehydroretinol freshwater fish. Internat. J. Vit. Nutr. Res. 61, 205-209.

- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126 (1), 131-138.
- Hilton, J.W., 1983. Hypervitaminosis A in rainbow trout (*Salmo gairdineri*): toxicity signs and maximum tolerable level. *J. Nutr.* 113, 1737-1745.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.* 29, 7-12.
- Kaneko, J.J., 1997 *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Mejia, L.A., Hodges, R.E., Rucker, R.B., 1979. Clinical signs of anemia in vitamin A-deficient rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 1439-1444.
- Nöll, G.N., 1996. High-performance liquid chromatographic analysis of retinal and retinol isomers. *Journal of chromatography*, v. 721, p. 247-259.
- NRC (National Research Council), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC, 114 pp.
- Pick, E., Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cell cultures. *J. Immunol. Methods.* 38, 161-170.
- Plumb J.A. & Bowser P.R., 1983. *Microbial Fish Disease Laboratory Manual*. Alabama Agricultural Experiment Station, Brown Printing Company, Montgomery, AL.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., 2007. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. Pages 47-51 in 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes. November 14-16, 2007, Botucatu, Brazil.
- Roodenburg, A.J.; West, C.E.; Yu, S.; Beynen, A.C., 1994. Comparison between time-dependent changes in iron metabolism of rats as induced by marginal deficiency of either vitamin A or iron. *British Journal of Nutrition*, v. 71, p. 687-699.
- Roodenburg, A.J.C., West, C.E., Hovenier, R., Beynen, A.C., 1996. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Brit. J. Nutr.* 75, 623-636.

- Saleh, G., Eleraky, W., Gropp, J.M., 1995. A short note on the effects of vitamin A hypervitaminosis and hypovitaminosis on health and growth of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Ichthyol. Short communication*. V. 11, p. 382-385.
- Secombes, C.J., 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; Van Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish Immunology*. Fair Haven: SOS Publications, p.137-154.
- Signor, A., 2007. Desempenho produtivo e resistência ao estresse pelo frio da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com levedura autolisada e zinco. Jaboticabal, 113 p. **Dissertação**.
- Steel, R.G.G.; Torrie, S.H. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2 ed. Auckland: McGraw-Hill International, 1984. 633p.
- Stephensen, C.B., 2001. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 21, p. 167-192.
- Strube, Y. N. J.; Beard, J. L.; Ross, A. C., 2002. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *Journal of Nutrition*, v. 132, p. 3607-3615.
- Svobodová, Z., Vysuková, B., 1991. Diagnostics; prevention and therapy of fish disease and intoxications. Manual for International Training Course on Fresh-Water Fish Diseases and Intoxications. Vodnany, Czechoslovaquia. 270 pp.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R., 2003. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.
- Thomas, J.S., 2000. Overview of plasma proteins. In: In: Feldman, B.F. et al. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia:Lippincott, p.891-898.
- Thompson, I.; Fletcher, T.C.; Houlihan, D.F.; Secombes, C.J., 1994. Effect of dietary vitamin A intake on the immunocompetence of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, v. 12, p. 513-523.
- Weyts, F.A., Verburg-van Kemenade, B.M., Flik, G., Lambert, J.G., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effects of cortisol and cortisone on carp lymphocytes. *Brain Behav. Immun.* 11, 95-105.

Wiedermann, U.; Chen, X.-J.; Enerbäck, L.; Hanson, L.A.; Kahu, H.; Dahlgren, U.I., 1996. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 44, p. 578-584.

Wintrobe, M.M. 1933. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51, 32-49.

Zile, M.H., Bunge, E.C., Deluca, H.F., 1979. On the physiological basis of vitamin A-stimulated growth. *J. Nutr.* 109, 1787-1796.

Tabela 1. Composição percentual e proximal da dieta basal

| Ingredientes (%)                 | 0     | 200   | 400   | 800   | 1.600 | 3.200 | 6.400 | 12.800 |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|                                  | UI/kg | UI/kg | UI/kg | UI/kg | UI/kg | UI/kg | UI/kg | UI/kg  |
| Farelo de soja                   | 62,2  | 62,2  | 62,2  | 62,2  | 62,2  | 62,2  | 62,2  | 62,2   |
| Quirera de arroz                 | 28,75 | 28,75 | 28,75 | 28,75 | 28,75 | 28,75 | 28,75 | 28,75  |
| Celulose                         | 0,7   | 0,7   | 0,7   | 0,7   | 0,7   | 0,7   | 0,7   | 0,7    |
| DL-Metionina                     | 0,45  | 0,45  | 0,45  | 0,45  | 0,45  | 0,45  | 0,45  | 0,45   |
| Treonina                         | 0,25  | 0,25  | 0,25  | 0,25  | 0,25  | 0,25  | 0,25  | 0,25   |
| Óleo de soja                     | 1,00  | 1,00  | 1,00  | 1,00  | 1,00  | 1,00  | 1,00  | 1,00   |
| Fosfato bicálcico                | 5,99  | 5,99  | 5,99  | 5,99  | 5,99  | 5,99  | 5,99  | 5,99   |
| Vitamina C <sup>1</sup>          | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,04   |
| NaCl <sup>2</sup>                | 0,10  | 0,10  | 0,10  | 0,10  | 0,10  | 0,10  | 0,10  | 0,10   |
| Suplemento vit/min <sup>3</sup>  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50   |
| BHT <sup>4</sup>                 | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02   |
| Composição proximal <sup>5</sup> |       |       |       |       |       |       |       |        |
| Umidade (%)                      | 8,13  | 8,13  | 8,13  | 8,13  | 8,13  | 8,13  | 8,13  | 8,13   |
| Proteína bruta (%)               | 30,62 | 30,62 | 30,62 | 30,62 | 30,62 | 30,62 | 30,62 | 30,62  |
| Lipídeo (%)                      | 4,18  | 4,18  | 4,18  | 4,18  | 4,18  | 4,18  | 4,18  | 4,18   |
| Cinzas (%)                       | 11,12 | 11,12 | 11,12 | 11,12 | 11,12 | 11,12 | 11,12 | 11,12  |
| Fibra bruta (%)                  | 5,17  | 5,17  | 5,17  | 5,17  | 5,17  | 5,17  | 5,17  | 5,17   |
| VitA (analisado)<br>(UI/kg)      | nd    | nd    | nd    | nd    | 767   | 1.420 | 3.560 | 6.470  |

<sup>1</sup> Vitamina C polifosfatada (DSM Stay C 35,0% atividade); <sup>2</sup> Cloreto de sódio; <sup>3</sup> Suplemento vitamínico e mineral (Supre Mais, níveis kg<sup>-1</sup> do produto): Vitamina D<sub>3</sub>, 200.000 UI; Vitamina E 1.200 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 2.400 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 4.800 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 4.800 mcg; Vitamina B<sub>6</sub>, 4.800 mg; Pantotenato de cálcio, 12.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Ácido fólico, 1.200 mg; Biotina, 48 mg; Cloreto de colina, 108 g; Cobalto, 10 mg; Cobre, 3.000 mg; Sulfato ferroso heptahidratado, 50.000 mg; Iodo, 100 mg; Manganês, 20.000 mg; Selênio, 100 mg; Sulfato de zinco, 30.000 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g; <sup>4</sup> β-hidroxi tolueno – antioxidante; <sup>5</sup> analisado.



Tabela 2. Perfil hematológico de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A e expostas à estímulo pelo frio ( $n = 5$ , média  $\pm$  desvio padrão)

| Tratamentos | Eritrócitos<br>( $10^6/\mu\text{L}$ ) |                                   | Hematócrito<br>(%)                 |                                    | Hemoglobina<br>(g/dL)             |                                   | VCM<br>(fL)                          |                                     | CHCM<br>(%)                       |                                   |
|-------------|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|             | Antes                                 | Após                              | Antes                              | Após                               | Antes                             | Após                              | Antes                                | Após                                | Antes                             | Após                              |
| 0 UI        | 1,14 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,06$      | -                                 | 15,25 <sup>a</sup><br>$\pm 0,35$   | -                                  | 4,21 <sup>a</sup><br>$\pm 0,03$   | -                                 | 134,01 <sup>ab</sup><br>$\pm 9,75$   | -                                   | 27,61 <sup>a</sup><br>$\pm 0,45$  | -                                 |
| 200 UI      | 1,14 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,36$      | -                                 | 13,38 <sup>a</sup><br>$\pm 3,35$   | -                                  | 3,42 <sup>a</sup><br>$\pm 1,19$   | -                                 | 118,52 <sup>a</sup><br>$\pm 6,87$    | -                                   | 25,13 <sup>a</sup><br>$\pm 3,50$  | -                                 |
| 400 UI      | 0,97 <sup>a</sup><br>$\pm 0,13$       | -                                 | 12,50 <sup>a</sup><br>$\pm 3,97$   | -                                  | 3,40 <sup>a</sup><br>$\pm 0,81$   | -                                 | 126,52 <sup>ab</sup><br>$\pm 23,41$  | -                                   | 27,68 <sup>a</sup><br>$\pm 3,38$  | -                                 |
| 800 UI      | 0,98 <sup>a</sup><br>$\pm 0,43$       | -                                 | 10,88 <sup>a</sup><br>$\pm 2,53$   | -                                  | 2,75 <sup>a</sup><br>$\pm 0,90$   | -                                 | 119,29 <sup>a</sup><br>$\pm 29,08$   | -                                   | 25,00 <sup>a</sup><br>$\pm 4,01$  | -                                 |
| 1600 UI     | 1,64 <sup>abcA</sup><br>$\pm 0,41$    | 1,39 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,49$  | 25,80 <sup>bbB</sup><br>$\pm 3,70$ | 17,00 <sup>aA</sup><br>$\pm 5,96$  | 6,83 <sup>bbB</sup><br>$\pm 1,27$ | 4,59 <sup>aA</sup><br>$\pm 1,76$  | 161,25 <sup>bbB</sup><br>$\pm 25,34$ | 122,01 <sup>abA</sup><br>$\pm 2,97$ | 26,36 <sup>aA</sup><br>$\pm 1,68$ | 26,71 <sup>aA</sup><br>$\pm 2,11$ |
| 3200 UI     | 1,95 <sup>bcdA</sup><br>$\pm 0,17$    | 1,94 <sup>abA</sup><br>$\pm 0,26$ | 28,10 <sup>bA</sup><br>$\pm 3,68$  | 23,86 <sup>abA</sup><br>$\pm 2,61$ | 7,34 <sup>bA</sup><br>$\pm 1,10$  | 6,68 <sup>abA</sup><br>$\pm 0,83$ | 129,72 <sup>abA</sup><br>$\pm 12,95$ | 122,68 <sup>abA</sup><br>$\pm 4,56$ | 26,11 <sup>aA</sup><br>$\pm 1,71$ | 27,97 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,56$ |
| 6400 UI     | 2,19 <sup>cdA</sup><br>$\pm 0,43$     | 2,12 <sup>bA</sup><br>$\pm 0,19$  | 27,70 <sup>bA</sup><br>$\pm 2,25$  | 26,10 <sup>bA</sup><br>$\pm 3,40$  | 7,32 <sup>bA</sup><br>$\pm 0,73$  | 7,42 <sup>bA</sup><br>$\pm 1,06$  | 142,22 <sup>abA</sup><br>$\pm 6,67$  | 123,65 <sup>bA</sup><br>$\pm 18,27$ | 26,41 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,64$ | 28,42 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,95$ |
| 12800 UI    | 2,48 <sup>eA</sup><br>$\pm 0,30$      | 2,20 <sup>bA</sup><br>$\pm 0,16$  | 30,87 <sup>bbB</sup><br>$\pm 2,72$ | 22,93 <sup>abA</sup><br>$\pm 3,16$ | 8,07 <sup>bbB</sup><br>$\pm 0,87$ | 6,40 <sup>abA</sup><br>$\pm 1,01$ | 124,82 <sup>abB</sup><br>$\pm 5,10$  | 103,33 <sup>aA</sup><br>$\pm 9,66$  | 26,13 <sup>aA</sup><br>$\pm 1,23$ | 27,83 <sup>aA</sup><br>$\pm 1,07$ |

Letras minúsculas são para comparação entre tratamentos fixado os momentos e letras maiúsculas são para comparação entre momentos dentro de cada tratamento ao nível de 5% de significância.

Tabela 3. Leucograma de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A e expostas à estimulação pelo frio ( $n = 5$ , média  $\pm$  desvio padrão)

| Tratamentos | Leucócitos (cél/s/ $\mu$ L) |                      | Linfócitos (cél/s/ $\mu$ L) |                     | Neutrófilos (cél/s/ $\mu$ L) |                     | Monócitos (cél/s/ $\mu$ L) |                    | Eosinófilos (cél/s/ $\mu$ L) |                   |
|-------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------|
|             | Antes                       | Após                 | Antes                       | Após                | Antes                        | Após                | Antes                      | Após               | Antes                        | Após              |
| 0 UI        | 13350 <sup>ab</sup>         | -                    | 11880 <sup>a</sup>          | -                   | 2700 <sup>a</sup>            | -                   | 2670 <sup>a</sup>          | -                  | 1335 <sup>a</sup>            | -                 |
|             | $\pm 1500$                  |                      | $\pm 8697$                  |                     | $\pm 2003$                   |                     | $\pm 4980$                 |                    | $\pm 3910$                   |                   |
| 200 UI      | 90500 <sup>a</sup>          | -                    | 81700 <sup>a</sup>          | -                   | 1145 <sup>a</sup>            | -                   | 3175 <sup>a</sup>          | -                  | 0,0 <sup>a</sup>             | -                 |
|             | $\pm 36500$                 |                      | $\pm 32994$                 |                     | $\pm 4127$                   |                     | $\pm 2859$                 |                    | $\pm 1560$                   |                   |
| 400 UI      | 100000 <sup>ab</sup>        | -                    | 91000 <sup>a</sup>          | -                   | 2970 <sup>a</sup>            | -                   | 1560 <sup>a</sup>          | -                  | 1000 <sup>a</sup>            | -                 |
|             | $\pm 35250$                 |                      | $\pm 35941$                 |                     | $\pm 3069$                   |                     | $\pm 2558$                 |                    | $\pm 3180$                   |                   |
| 800 UI      | 63250 <sup>a</sup>          | -                    | 70135 <sup>a</sup>          | -                   | 1085 <sup>a</sup>            | -                   | 1925 <sup>a</sup>          | -                  | 1690 <sup>a</sup>            | -                 |
|             | $\pm 41500$                 |                      | $\pm 31874$                 |                     | $\pm 4812$                   |                     | $\pm 1089$                 |                    | $\pm 1113$                   |                   |
| 1600 UI     | 180000 <sup>bA</sup>        | 118000 <sup>aA</sup> | 162360 <sup>ab</sup>        | 94164 <sup>aA</sup> | 7200 <sup>aA</sup>           | 24780 <sup>ab</sup> | 2500 <sup>aA</sup>         | 1380 <sup>bA</sup> | 2400 <sup>aA</sup>           | 190 <sup>aA</sup> |
|             | $\pm 65000$                 | $\pm 72000$          | $\pm 45985$                 | $\pm 42546$         | $\pm 14766$                  | $\pm 12757$         | $\pm 3228$                 | $\pm 2405$         | $\pm 1354$                   | $\pm 708$         |
| 3200 UI     | 121500 <sup>abA</sup>       | 64000 <sup>aA</sup>  | 109593 <sup>ab</sup>        | 50176 <sup>aA</sup> | 6650 <sup>aA</sup>           | 8925 <sup>ab</sup>  | 1970 <sup>aA</sup>         | 665 <sup>abA</sup> | 1500 <sup>aA</sup>           | 0,0 <sup>aA</sup> |
|             | $\pm 39500$                 | $\pm 6000$           | $\pm 27256$                 | $\pm 7885$          | $\pm 3449$                   | $\pm 6672$          | $\pm 5147$                 | $\pm 570$          | $\pm 1989$                   | $\pm 320$         |
| 6400 UI     | 180000 <sup>bA</sup>        | 117500 <sup>aA</sup> | 159120 <sup>ab</sup>        | 94705 <sup>aA</sup> | 12670 <sup>aA</sup>          | 18000 <sup>ab</sup> | 3460 <sup>aA</sup>         | 0,0 <sup>aA</sup>  | 2480 <sup>aA</sup>           | 600 <sup>aA</sup> |
|             | $\pm 45200$                 | $\pm 45000$          | $\pm 32205$                 | $\pm 33609$         | $\pm 7699$                   | $\pm 9347$          | $\pm 4600$                 | $\pm 527$          | $\pm 1803$                   | $\pm 646$         |
| 12800 UI    | 118500 <sup>abA</sup>       | 61000 <sup>aA</sup>  | 103095 <sup>ab</sup>        | 47238 <sup>aA</sup> | 6325 <sup>aA</sup>           | 13815 <sup>ab</sup> | 4530 <sup>aA</sup>         | 659 <sup>abA</sup> | 1265 <sup>aA</sup>           | 126 <sup>aA</sup> |
|             | $\pm 45000$                 | $\pm 15329$          | $\pm 31731$                 | $\pm 8883$          | $\pm 4241$                   | $\pm 6841$          | $\pm 1832$                 | $\pm 138$          | $\pm 774$                    | $\pm 279$         |

Letras minúsculas são para comparação entre tratamentos fixado os momentos e letras maiúsculas são para comparação entre momentos dentro de cada tratamento ao nível de 5% de significância.

Tabela 4. Proteína plasmática total (PPT), globulinas, albumina (ALB) e relação albumina:globulina (A:G) de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A e submetidas a estímulo pelo frio ( $n = 5$ , média  $\pm$  desvio padrão)

| Tratamentos       | Vit. A<br>(analisado) | PPT<br>(g/dL)                   |                                 | ALB<br>(g/dL)                    |                                   | Globulinas<br>(g/dL)            |                                 | A:G                             |                                  |
|-------------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                   |                       | Antes                           | Após                            | Antes                            | Após                              | Antes                           | Após                            |                                 |                                  |
| 1600 UI           | 767 UI                | 2,56 <sup>A</sup><br>$\pm 0,18$ | 2,03 <sup>B</sup><br>$\pm 0,34$ | 1,39 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,17$ | 0,57 <sup>cB</sup><br>$\pm 0,09$  | 1,18 <sup>A</sup><br>$\pm 0,11$ | 1,46 <sup>A</sup><br>$\pm 0,25$ | 1,19 <sup>A</sup><br>$\pm 0,21$ | 0,39 <sup>bB</sup><br>$\pm 0,01$ |
| 3200 UI           | 1420 UI               | 3,43 <sup>A</sup><br>$\pm 0,29$ | 2,86 <sup>B</sup><br>$\pm 0,26$ | 0,87 <sup>bA</sup><br>$\pm 0,08$ | 1,04 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,22$  | 2,56 <sup>A</sup><br>$\pm 0,32$ | 1,82 <sup>B</sup><br>$\pm 0,14$ | 0,34 <sup>B</sup><br>$\pm 0,07$ | 0,57 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,13$ |
| 6400 UI           | 3560 UI               | 4,43 <sup>A</sup><br>$\pm 0,33$ | 3,13 <sup>B</sup><br>$\pm 0,10$ | 1,37 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,07$ | 0,94 <sup>abB</sup><br>$\pm 0,09$ | 3,05 <sup>A</sup><br>$\pm 0,29$ | 2,19 <sup>B</sup><br>$\pm 0,15$ | 0,45 <sup>A</sup><br>$\pm 0,04$ | 0,43 <sup>bA</sup><br>$\pm 0,06$ |
| 12800 UI          | 6470 UI               | 3,56 <sup>A</sup><br>$\pm 0,38$ | 2,37 <sup>B</sup><br>$\pm 0,17$ | 1,28 <sup>aA</sup><br>$\pm 0,23$ | 0,80 <sup>bB</sup><br>$\pm 0,06$  | 2,28 <sup>A</sup><br>$\pm 0,28$ | 1,57 <sup>B</sup><br>$\pm 0,13$ | 0,56 <sup>A</sup><br>$\pm 0,11$ | 0,51 <sup>bA</sup><br>$\pm 0,04$ |
| Efeito linear     |                       | <i>ns</i>                       | <i>ns</i>                       | <i>ns</i>                        | <i>ns</i>                         | <i>ns</i>                       | <i>ns</i>                       | <i>ns</i>                       | <i>ns</i>                        |
| Efeito quadrático |                       | $P < 0,001$                     | $P < 0,001$                     | <i>ns</i>                        | <i>ns</i>                         | $P < 0,001$                     | $P < 0,001$                     | $P < 0,001$                     | <i>ns</i>                        |

Letras minúsculas são para comparação entre tratamentos fixado os momentos e letras maiúsculas são para comparação entre momentos dentro de cada tratamento ao nível de 5% de significância.

Tabela 5. Produção de espécies reativas de oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO) por monócitos de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de vitamina A e submetidas à estimulo pelo frio e desafiadas com *A. hydrophila*

| Tratamentos   | Vit. A<br>(analisado) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - |                              | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |               | NO                           |               |                             |
|---------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|-----------------------------|
|               |                       | PMA<br>(nmol)                   | Antes                        | Antes                         | Bactéria      | Frio                         | Bactéria      | Frio                        |
| 800 UI        | nd*                   | 1,04<br>±0,11                   | 0,95 <sup>abA</sup><br>±0,21 | 0,49 <sup>B</sup><br>±0,12    | -             | 10,25 <sup>aA</sup><br>±1,90 | -             | 3,51 <sup>aB</sup><br>±0,49 |
| 1600 UI       | 767 UI                | 0,89<br>±0,24                   | 0,90 <sup>abA</sup><br>±0,24 | 0,67 <sup>A</sup><br>±0,35    | 0,17<br>±0,07 | 2,30 <sup>bB</sup><br>±0,79  | 3,86<br>±1,58 | 4,42 <sup>aA</sup><br>±0,99 |
| 3200 UI       | 1420 UI               | 1,48<br>±0,74                   | 1,36 <sup>bA</sup><br>±0,41  | 0,41 <sup>B</sup><br>±0,11    | 0,43<br>±0,02 | 6,49 <sup>abA</sup><br>±4,59 | 2,83<br>±0,97 | 8,47 <sup>bA</sup><br>±2,25 |
| 6400 UI       | 3560 UI               | 1,09**<br>±0,31                 | 0,56 <sup>aA</sup><br>±0,12  | 0,47 <sup>A</sup><br>±0,35    | 1,22          | 3,10 <sup>bA</sup><br>±1,05  | 7,90          | 3,04 <sup>aA</sup><br>±1,29 |
| 12800 UI      | 6470 UI               | 1,44**<br>±0,67                 | 0,44 <sup>aA</sup><br>±0,27  | 0,41 <sup>A</sup><br>±0,29    | 0,30<br>±0,06 | 4,59 <sup>bA</sup><br>±1,15  | 1,57<br>±0,82 | 2,44 <sup>aB</sup><br>±0,88 |
| Efeito linear |                       |                                 |                              |                               |               |                              |               |                             |
| <i>ns</i>     |                       |                                 |                              |                               |               |                              |               |                             |

Letras minúsculas são para comparação entre tratamentos fixado os momentos e letras maiúsculas são para comparação entre momentos dentro de cada tratamento ao nível de 5% de significância.

\* nd – não detectado; \*\* efeito significativo da adição de PMA.

Tabela 6. Número médio de dias para a primeira mortalidade e mortalidade cumulativa de tilápias do Nilo após 15 dias de desafio com *Aeromonas hydrophila*

| Níveis de VitA | Dias para primeira Mortalidade | Mortalidade cumulativa (%) |
|----------------|--------------------------------|----------------------------|
| 1.600 UI       | 6,50<br>±6,36                  | 66,87                      |
| 3.200 UI       | 5,60<br>±1,98                  | 78,57                      |
| 6.400 UI       | 5,40<br>±0,49                  | 87,50                      |
| 12.800 UI      | 7,10<br>±1,2                   | 81,25                      |

# Capítulo 4

**AUSÊNCIA E SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A NO DESEMPENHO,  
RESPOSTA IMUNE E RESISTÊNCIA DA TILÁPIA DO NILO À INFECÇÃO  
POR *Streptococcus iniae***

**RESUMO** – Um experimento com duração de 10 semanas foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de megadoses de vitamina A (vitA) sobre o desempenho, parâmetros hematológicos e imunológicos, e resistência da tilápia do Nilo à infecção experimental com *S. iniae*. Setecentos alevinos de tilápia do Nilo com peso médio inicial de  $5,26 \pm 0,10$ g (média  $\pm$  SD) foram distribuídos aleatoriamente em 20 aquários com volume de 57L cada e alimentados com dietas purificadas contendo níveis crescentes de vitA (0, 2.500, 5.000, 10.000 e 20.000 UI de vitA/kg da dieta). A fonte de vitamina A foi o acetato de retinol (USB, 500.000 UI/g). Os peixes foram pesados a cada 15 dias, e as dietas pesadas diariamente, para a determinação dos parâmetros de desempenho ao longo do experimento. Ao final do período experimental e nas semanas quatro e oito, foi coletado sangue de três peixes por aquário para determinação dos parâmetros hematológicos e da fragilidade eritrocitária (FE, somente na semana 10). Na semana 10, foi coletado sangue de cinco peixes adicionais por aquário para os parâmetros séricos [proteína total do soro, atividade da via alternativa do complemento (SH<sub>50</sub>), atividade da lisozima e o conteúdo de imunoglobulina sérica (Ig)]. Ainda, quatro peixes por aquário foram separados para isolamento e coleta de macrófagos peritoneais e posterior avaliação da atividade do *burst* respiratório de fagócitos (produção de ânion superóxido). Foi realizada, ainda, infecção experimental com *S. iniae* durante 21 dias. A suplementação de vitamina A influenciou o crescimento dos animais, sendo que os melhores níveis para o ótimo fisiológico variaram de 1.543 a 2.403 UI/kg da dieta; a utilização deste último nível compreende os valores de exigência obtidos para os parâmetros hematológicos. A deficiência de vitA reduz drasticamente o desempenho dos animais e os parâmetros hematológicos, possuindo limitado efeito sobre os parâmetros imunológicos e na resistência dos animais à infecção com *S. iniae*, entretanto esta vitamina parece possuir grande poder antioxidante evidenciado pela reduzida FE. Os peixes deficientes em vitamina A apresentaram reduzido crescimento, hemorragias na pele, lábios e base das nadadeiras levando ao quadro hemorrágico

severo após 10 semanas com deformidade óssea e nos opérculos. A anemia observada nos animais deficientes pode ser classificada como macrocítica.



**EFFECT OF VITAMIN A MEGADOSES AND DEFICIENCY ON GROWTH,  
IMMUNE RESPONSE AND RESISTANCE OF NILE TILAPIA TO *Streptococcus*  
*iniae* INFECTION**

**ABSTRACT** - A 10 week feeding trial was undertaken to evaluate the effect of vitamin A megadoses on growth, hematological and immune parameters, and resistance to *S. iniae* infection of Nile tilapia. Seven hundred Nile tilapia fingerlings with  $5.26 \pm 0.10$ g weight (mean $\pm$ SD) were randomly stocked into 20 57L-aquaria and fed purified diets containing graded levels of vitamin A (0; 2,500; 5,000; 10,000; 20,000; IU vit. A/kg diet). Vitamin source was retinol acetate (USB, 500,000/g). Fish were weighed fortnightly and diets were weighed in a daily basis to determine the growth performance along the experiment. At the end of the experimental period and at wk 4 and 8 fish were bled for hematology and to determine the erythrocyte osmotic fragility (EOF, only at wk 10). At wk 10, five additional fish per aquarium were bled for serum work [total serum protein, spontaneous hemolytic complement activity (SH<sub>50</sub>), lysozyme activity, serum immunoglobulin content (Ig)]. Four fish per aquarium were already separated for isolation and collection of peritoneal macrophages to evaluate phagocytes *burst* respiratory activity (superoxide anion production). An experimental infection with *S. iniae* was performed during 21 days. Vitamin A supplementation the growth performance of Nile tilapia and the levels which seems to meet the physiological optimum varied from 1,543 to 2,403 IU/kg diet; the use of this last value comprises the requirement values obtained for hematological parameters. The deficiency of vitA reduces drastically the growth and hematological parameters, showing limited effect on immune response and resistance of fish to *S. iniae* infection. However, this vitamin seems to have a great antioxidant effect due to the linear reduced EOF in fish fed vitA supplemented diets. VitA deficient fish showed reduced growth, hemorrhages on skin, lips and base of fins leading to a severe hemorrhagic pattern after 10 weeks accompanied by bone and operculum deformities. Anemia observed in deficient fish was classified as macrocytic.

## **Introdução**

Em sistemas de produção aquícolas intensivos, os peixes enfrentam, em seus ambientes, diferentes fatores estressores durante o ciclo de produção. Geralmente esses agentes estressores induzem a baixa resistência dos peixes à bactérias comumente encontradas no ambiente e no corpo do animal conduzindo ao quadro septicêmico com altas taxas de mortalidade. Portanto, diversas pesquisas têm descrito formas de manipular a saúde dos peixes e a resistência à doenças. Entre as técnicas utilizadas, a modulação nutricional da saúde tem sido estudada e diferentes propriedades funcionais, além das demandas fisiológicas têm sido salientadas.

Estudos recentes têm objetivado avaliar o efeito da suplementação de vitaminas e minerais, acima das exigências nutricionais, sobre o sistema imune de peixes. Embora os resultados mais promissores tenham sido obtidos, principalmente, com a vitamina C e E, e zinco, poucos estudos têm descrito os efeitos de altos níveis de vitamina A sobre o desempenho e a saúde dos peixes.

A vitamina A é um composto lipossolúvel cujos derivados estão envolvidos em um grande número de processos fisiológicos, incluindo a manutenção do desenvolvimento das células epiteliais, desenvolvimento ósseo, reprodução e visão. Desta forma, é considerada nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento normal de um organismo. A exigência desta vitamina para peixes encontra-se entre 1000 e 8000 UI/kg de ração (Halver, 1982; Halver, 1989; Mohamed et al., 2003; Moren et al., 2004), enquanto a exigência para a tilápia tem sido descrita entre 5000 e 6970 UI/kg (Saleh et al., 1995; Hu et al., 2006). No entanto, em pesquisa anteriormente realizada com esta espécie observou-se que o nível de 1988 UI proporcionou resultados satisfatórios de desempenho produtivo em dietas práticas para tilápia do Nilo (Guimarães et al., 2007).

Além dessas funções, diversos estudos têm demonstrado a potencial função da vitamina A na manutenção da integridade do sistema imune. Resultados com animais terrestres e seres humanos têm demonstrado que a deficiência dessa vitamina resulta em reduzida resposta humoral e celular do sistema imune levando a maior susceptibilidade à doenças infecciosas, enquanto níveis elevados têm proporcionado efeito protetor (Cuesta et al., 2002; Stephensen, 2001). No entanto, até o presente momento nenhum resultado com relação a esse efeito da vitamina A com a tilápia do Nilo foi publicado.

Com base no exposto, este estudo objetivou avaliar o efeito da ausência, subdosagem e doses elevadas de vitamina A sobre o desempenho, resposta imune e resistência à infecção de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas.

## **Material e métodos**

### *Dietas*

Uma dieta basal (Tabela 1) foi produzida utilizando ingredientes purificados. As dietas foram formuladas de forma a atender as exigências da tilápia do Nilo (NRC, 1993) sendo isoprotéicas (34%), isolipídicas (6%) e isoenergéticas (3200 kcal ED/kg). A fonte de vitamina A utilizada neste estudo foi o acetato de retinila com 500.000 UI/g de atividade (USB, Cleveland, USA) e incorporada às dietas em substituição ao inerte (Celufil, USB). Os níveis de vitamina A utilizados foram 2.500, 5.000, 10.000, 20.000 UI/kg e uma dieta controle ausente de suplementação.

As dietas foram mecanicamente homogeneizadas com água (25% do peso seco) num misturador Hobart (Hobart Corporation, Troy, Ohio) e peletizadas num moedor de carne da marca Hobart em péletes com 3 mm de diâmetro. Os péletes resultantes foram secos ao ar livre (23 °C) até atingirem teor de umidade ao redor de 10%. Os péletes foram moídos e classificados de acordo com o tamanho dos peixes, sendo então armazenados em sacolas plásticas à -8 °C até utilização.

### *Peixes e procedimento experimental*

Um experimento com duração de 10 semanas foi realizado para avaliar o efeito de megadoses de vitamina A sobre o desempenho, resposta imune e resistência à infecção experimental com *S. iniae* de tilápias do Nilo. Alevinos de tilápia do Nilo produzidos no USDA-ARS, Aquatic Animal Health Research Unit, receberam por 10 dias a dieta basal ausente em vitamina A de forma a adaptar os animais às dietas e reduzir o estoque de vitA no fígado. Setecentos alevinos de tilápia com peso médio inicial de 5,26 ±0.10g foram aleatoriamente alojados em 20 aquários de 57L cada na densidade de 35 peixes/aquário. Os aquários eram conectados à um sistema de fluxo contínuo de água com controle de temperatura. O fluxo de água no início do experimento foi de 0,4 L/min aumentando gradativamente até atingir 1,0 L/min na oitava semana experimental, sendo monitorado e ajustado duas vezes ao dia. A água foi

aerada continuamente com pedras porosas e o fotoperíodo utilizado foi de 12 horas de luz e 12 de escuro. O oxigênio dissolvido (OD) e a temperatura da água foram mensurados em dias alternados em quatro aquários selecionados aleatoriamente; as fezes acumuladas foram removidas por sifonamento e os aquários foram limpos toda semana.

As dietas foram distribuídas aleatoriamente aos aquários, perfazendo cinco tratamentos com quatro repetições (grupo de peixes). Os peixes foram alimentados manualmente até alcançarem a saciedade aparente. A frequência alimentar utilizada no experimento foi de duas vezes ao dia, às 07:30 e 14:20 h. Durante o experimento o nível de OD e a temperatura da água foram mantidos em níveis adequados para o cultivo da tilápia (OD de  $6.2 \pm 0.3$  mg L<sup>-1</sup> e temperatura de  $26 \pm 0.6$  °C).

Durante o experimento a mortalidade dos peixes foi monitorada e os sinais clínicos de deficiência de vitamina A foram observados. Ao final do período experimental e antes de cada amostragem, os peixes permaneceram em jejum por 24 h, sendo então pesados e examinados para sinais de deficiência de vitA. Os peixes foram anestesiados com metanosulfonato de triclaína (MS-222; Argent Chemical Laboratories, Redmond, WA) antes de qualquer manejo, amostragem ou desafio. Os peixes amostrados foram mortos em solução contendo 200 mg/L de MS-222.

#### *Índice hepatossomático e conteúdo de vitamina A no fígado*

Ao final do período experimental de desempenho (10 semanas), os fígados de cinco peixes por aquário, que tinham sido utilizados para análise sorológica, foram removidos e individualmente pesados para determinação do índice hepatossomático, feito um *pool* e armazenados à -80 C para determinação do conteúdo de retinol. A análise de vitamina A do fígado e das dietas foi realizada no Thad Cochran National Warmwater Aquaculture Center, Mississippi State University, Stoneville, Mississippi.

#### *Hematologia e proteína sérica*

Nas semanas 4 e 8 e ao final do período experimental quatro peixes foram aleatoriamente coletados de cada aquário e anestesiados com metanosulfonato de triclaína (MS-222) na concentração de 150 mg/L. Amostras de sangue foram coletadas por meio de punção do vaso caudal utilizando-se seringas banhadas em heparina (100

IU/mL) para as análises hematológicas. A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada em duplicata para cada amostra por meio de diluição do sangue (1:10000) e contagem em hemocítmetro. A taxa de hemoglobina foi determinada utilizando o método da cianometahemoglobina (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). Os valores de hemoglobina foram ajustados por meio de fator de correção da cianometahemoglobina para o bagre do canal, conforme descrito por Larsen (1964). A porcentagem de hematócrito de cada peixe foi também determinada em duplicata utilizando o método do microhematócrito (Brown, 1988).

Apenas no final do período experimental, foi coletado sangue de mais cinco peixes por aquário utilizando seringas não-heparinizadas e deixando coagular à temperatura de 4 °C por duas horas. As amostras de soro foram coletadas após centrifugação e armazenadas à -80 °C até utilização.

A concentração total de proteína no soro foi mensurada em duplicata utilizando o método do Biureto. Duzentos e cinquenta µL do reagente para a determinação da proteína total (Sigma Chemical) foi adicionado a cada poço da microplaca. Posteriormente, 5 µL de soro foi adicionado a cada poço. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foram lidas à 570 nm utilizando leitor de microplacas (Bio-Bind, model 680, Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ, USA). A concentração de proteína no soro foi calculada usando albumina sérica bovina como padrão externo.

#### *Fragilidade eritrocitária*

A fragilidade eritrocitária (FE) foi mensurada como a taxa de hemólise em solução salina com diferentes concentrações como descrito por Ezell et al. (1969) com algumas modificações. Resumidamente, uma solução salina contendo NaCl na concentração de 10 g/L foi preparada usando água deionizada e diluída em diversas concentrações variando de 0.0 à 0.85% (w/v). Aliquotas de sangue (8 µL) foram adicionadas a cada concentração numa microplaca com 24 poços e então cuidadosamente misturados e incubados por 30 min à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas à 1500 ×g por 10 min. Posteriormente, 300 µL do sobrenadante foi transferido para microplacas de 96 poços e a absorbância foi mensurada à 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada usando a concentração

de 0,85% como branco (0% de hemólise) e a concentração de 0.0% como 100% de hemólise. Para as análises estatísticas a taxa de 50% de hemólise para cada amostra foi determinada.

#### *Parâmetros imunológicos*

A atividade da lisozima sérica foi determinada de acordo com o método descrito por Litwack (1955) modificado por Sankaran e Gurnani (1972). Esta análise baseia-se na lise da bactéria Gram-positiva sensível à lisozima, *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, St. Louis, MO), pela lisozima presente no soro dos peixes. Amostras de soro (5 µl/poço em duplicata) foram adicionadas à uma microplaca, e 250 µl da suspensão de *M. lysodeikticus* foi adicionada a cada poço. Lisozima da clara de ovo foi utilizada como padrão externo. As absorbâncias iniciais e finais (após 20 min de incubação à 35 °C) das amostras foram mensuradas à 450 nm. A taxa de redução na absorbância das amostras foi convertida à concentração de lisozima (µg/ml) utilizando a curva padrão.

A atividade da via alternativa do complemento (SH<sub>50</sub>) foi determinada de acordo com o método de Sunyer e Tort (1995). Resumidamente, eritrócitos de ovelhas (SRBC) em solução Alsever (Remel, Inc., Lanexa, KS) foram adicionados ao soro de tilápia previamente diluído em série em solução resfriada de tampão fosfato (PBS+) (0.85% PBS, 0.1% gelatina, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) em microplacas com poços de fundo côncavo. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h. Após incubação, as placas foram centrifugadas à 200 ×g, e o sobrenadante removido para nova microplaca. A taxa de hemólise foi avaliada espectrofotometricamente à 570 nm e convertida à porcentagem de hemólise com base nos controles com água destilada. O ponto de 50% de lise (SH<sub>50</sub>) foi calculado por meio de regressão linear e cada amostra de soro foi expressa como log da diluição.

O conteúdo de imunoglobulina (Ig) total do soro foi determinado usando o método descrito por Siwicki e Anderson (1993). Resumidamente, 30 µL de soro foi misturado com igual volume de solução de polietileno glicol (PEG) à 12% (10.000 MW, Sigma) em uma microplaca de fundo côncavo e incubada por 12 horas para decantar as moléculas de Ig. Após incubação, as placas foram centrifugadas à 500 ×g à 4°C. Dez µL do sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outra placa e o conteúdo de proteína foi determinado como mencionado anteriormente. A diferença

entre o conteúdo total da proteína do soro da amostra e a quantidade de proteína das amostras tratadas com PEG correspondeu ao conteúdo total de Ig no soro e foi expresso em mg/mL.

#### *Isolamento e coleta de macrófagos peritoneais*

Ao final da 10<sup>a</sup> semana experimental, quatro peixes de cada aquário foram separados e injetados intraperitonealmente (IP) com 0.25 mL de esqualeno (Sigma Chemical) como atratante para macrófagos. A alimentação dos peixes foi continuada com as mesmas dietas. Após cinco a seis dias, os peixes foram anestesiados com MS-222 e injetados IP com 15 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS) resfriado usando agulha de 20G conectada à uma válvula de três pontos. Posteriormente, PBS foi removido juntamente com células do exudato em um tubo de 50 mL. Os fluidos peritoneais dos peixes do mesmo aquário foram combinados e centrifugados à 2000 ×g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os péletes foram resuspenso em 1 mL de solução balanceada de Hank (HBSS) sem phenol red (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA). O número de macrófagos em cada amostra foi contado por meio de coloração com solução hematológica de Yokoyama e enumerados em hemocitômetro para utilização na determinação da produção de ânion superóxido.

#### *Produção de ânion superóxido*

O *burst* respiratório de células fagocíticas, com base na produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), foi medido pela redução do nitroble tetrazolium (NBT) com base no método de Secombes (1990) com algumas modificações. Quatro monocamadas de solução de leucócitos ricas em macrófagos peritoneais isolados previamente ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram adicionadas à microplacas. Após incubação por 2 h à temperatura ambiente em uma câmara umidificada, os poços foram lavados com PBS à 0.85% para remover as células não aderentes. As camadas de leucócitos aderentes foram incubadas com solução de NBT por 1 h (0,2% w/v em solução salina) para estimular a atividade do *burst* respiratório. Após remoção do meio, metanol à 100% foi adicionado para parar a reação e os poços foram lavados duas vezes com metanol à 70% e deixados para secar a temperatura ambiente. A formazana reduzida das células aderentes foi solubilizada adicionando-se 120 µL de hidróxido de potássio (KOH) à 2 M e 140 µL de

dimethylsulphoxide (DMSO) em cada poço. Após incubação em agitador horizontal (100 rpm) por 10 min, a densidade óptica das amostras foi mensurada à 620 nm usando KOH/DMSO como referência.

#### *Desafio bacteriano*

Cultura estoque congelada de *S. iniae* (ARS 98-60) isolada da tilápia do Nilo foi cultivada em tryptic soy broth (TSB) à 25 °C com agitação (100 rpm) por 18 horas. A concentração da cultura foi ajustada para densidade óptica de 1,03 medida em espectrofotômetro Biorad SmartSpec 3000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) à 540 nm de modo a obter a concentração de *S. iniae* de  $1 \times 10^9$  unidas formadoras de colônia (UFC)/mL. A concentração desejada de bactéria foi preparada em meio estéril por diluições em série. Após amostragem para as análises hematológicas, o número de tilápias remanescentes nos aquários foi ajustado para 18 e todos os peixes de cada aquário foram desafiados por meio de injeção IP com 100 µl de cultura de *S. iniae* contendo  $1.0 \times 10^4$  UFC/ml ( $1.0 \times 10^3$  UFC/peixe). Após injeção, os peixes retornaram aos respectivos aquários. Cada grupo de peixes continuou a ser alimentado duas vezes ao dia com suas respectivas dietas por 21 dias.

#### *Título de anticorpo*

Antes do desafio bacteriano, foi coletado sangue de cinco peixes de cada aquário para determinação da resposta de anticorpo contra *S. iniae*. Ao final do desafio experimental (22º dia), foi coletado sangue por punção do vaso caudal de quatro peixes e deixado coagular por 2 h à 4 °C, e centrifugados à 1000 ×g. O soro foi coletado e armazenado à -80 °C para subsequente determinação do título de anticorpo contra *S. iniae* pelo método modificado de Chen e Light (1994). *S. iniae* (ARS 98-60) foi cultivado em TSB por 18 h e mortos com formalina à 10%. A suspensão celular bacteriana foi centrifugada à 1000 × g por 15 min e o sobrenadante foi descartado. Os péletes resultantes foram lavados quatro vezes com PBS e resuspenso em PBS de modo a obter densidade óptica de 0,8 à 540 nm. Diluições em série do soro (iniciando com 30 µL de soro e 30 µL de PBS) foram realizadas em microplacas de fundo côncavo adicionando 30 µL do soro diluído nos poços contendo 30 µL de PBS. Após este procedimento, 10 µL da suspensão bacteriana foi adicionada a cada poço. As placas



foram cobertas com papel filme e incubadas à temperatura ambiente por 16-18 horas. O ponto de término da aglutinação foi estabelecido como a última diluição do soro onde a aglutinação das células foi visível após incubação. Os títulos de anticorpo foram descritos como  $\log_2$  do valor recíproco da mais alta diluição do soro a qual mostrou aglutinação visível quando comparada com o controle positivo.

#### *Análise estatística*

Os dados foram analisados por meio da ANAVA utilizando o procedimento GLM do SAS (Statistic Analysis Systems, SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina). Os dados de mortalidade aos 21 dias após desafio foram transformados pela expressão  $y = \arcsen \sqrt{x/100}$ , sendo  $x$  o valor da variável expresso em porcentagem. O teste de Duncan foi utilizado para comparar as médias dos tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes à  $P < 0,05$ . Ainda, quando o modelo de regressão apresentou-se significativo, os dados foram analisados pela regressão broken-line para determinar o ponto na curva de resposta que representa a mínima concentração de vitamina A da dieta (Robbins et al., 1979).

#### **Resultados**

Reduzido apetite e ganho de peso foram observados ao longo de todo período experimental nos peixes alimentados com a dieta ausente em vitamina A. Após 10 dias de alimentação com a dieta ausente (período de aclimatação), os animais apresentaram lábios hemorrágicos. Este foi o primeiro sinal de deficiência de vitA observado e necessitou de cinco dias para total aparecimento nos animais alimentados com as dietas suplementadas com 2.500 UI, enquanto os animais suplementados com os demais níveis necessitaram de dois dias para o total desaparecimento deste sinal.

Após 21 dias, os peixes alimentados com a dieta ausente de vitA começaram a apresentar hemorragia na base das nadadeiras e do opérculo. Na 8ª semana, alguns animais apresentavam deformidade no opérculo e apatia, permanecendo no fundo dos aquários. Na 10ª semana, os peixes deficientes apresentavam sangramento após manuseio e em alguns animais deformidades ósseas. Embora os peixes tenham apresentado padrão de deficiência severa de vitA a partir da segunda semana de

alimentação com a dieta ausente de suplementação de vitA, nenhuma mortalidade nem sinal de exoftalmia foram observados nesses animais.

Os dados de crescimento apresentaram-se estatisticamente diferentes a partir da segunda semana, demonstrando o rápido efeito da ausência deste nutriente nas dietas (Tabela 2). Os valores de exigência para o ganho de peso variaram de 1.543 à 2.058 UI/kg da dieta ao longo do experimento, enquanto que para o consumo de ração (CR) valores superiores foram obtidos. Os valores de exigência para o CR variaram de 2.122 a 2.403 UI e apresentaram redução após a segunda semana, mantendo esses valores ao longo das demais semanas. A regressão para a eficiência alimentar (EA) foi significativa apenas na 10<sup>a</sup> semana e a exigência estimada para este parâmetro foi de 1.753 UI/kg da dieta. Embora diferenças tenham sido observadas na segunda semana para a EA, os peixes alimentados com 10.000 e 20.000 UI de vitA apresentaram valores similares de EA comparado com os animais que receberam a dieta ausente. No entanto, este efeito não foi observado nas semanas subsequentes.

Na tabela 3 estão apresentados os parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo arraçadas com diferentes níveis de vitA. A exigência estimada com base no número de eritrócitos variou de 1.590 à 2.244 UI de vitA/kg da dieta e aumentou de acordo com a idade do animal. Embora diferenças tenham sido observadas na 4<sup>a</sup> semana para o número de leucócitos (Leuc), apenas os peixes alimentados com 5.000 e 10.000 UI de vitA apresentaram diferença estatística. Na 8<sup>a</sup> semana, a maior contagem de Leuc foi observada para os peixes alimentados com 10.000 e 20.000 UI de vitA, enquanto os demais animais apresentaram valores semelhantes. Apesar de diferenças pontuais terem sido observadas para Leuc ao longo do experimento, a suplementação de vitA às dietas não pareceu influenciar a série branca do sangue devido, principalmente, à ausência de um padrão de resposta, como observado para os demais parâmetros hematológicos. A exigência estimada obtida para a taxa de hemoglobina foi de 1.665 e 1.726 UI de vitA na 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semanas, respectivamente. Na 4<sup>a</sup> semana, a regressão não foi significativa. No entanto, os valores apresentaram a mesma tendência dos demais períodos com drástica redução da taxa de hemoglobina nos peixes alimentados com a dieta ausente em vitA.

Com base na porcentagem de hematócrito, a exigência de vitA estimada encontrou-se entre 1.325 e 2.226 UI tendendo à redução dos valores ao longo do

experimento, padrão diferente daquele observado para a contagem de eritrócitos (Erit). Com exceção do MCHC na 8ª semana, maiores valores de MCV e MCHC foram observados nos peixes alimentados com a dieta ausente de suplementação de vitA ao longo do experimento. No entanto, diferenças estatísticas foram observadas somente nos animais alimentados com a dieta ausente de suplementação e àqueles alimentados com a dieta suplementada com o maior nível de vitA (20.000 UI) na 8ª semana. Maior porcentagem de hemólise (FE) foi observada nos animais alimentados com a dieta ausente em vitA seguido daqueles alimentados com 2.500 UI de vitA (Tabela 4). A menor FE foi observada no grupo alimentado com ração suplementada com 20.000 UI de vitA, entretanto não foi diferente dos animais alimentados com rações suplementadas com 10.000 e 5.000.

Os peixes alimentados com rações suplementadas com 5.000 e 10.000 UI de vitA apresentaram a maior produção de ânion superóxido comparado com os animais alimentados com os demais níveis (Tabela 5). No entanto, os peixes deficientes não apresentaram diferença significativa quando comparados com àqueles alimentados com 2.500 e 20.000 UI de vitA. Diferença foi observada, somente, entre os peixes deficientes e àqueles alimentados com rações suplementadas com 20.000 UI. Embora, tenha sido observado menores valores de proteína sérica nos peixes alimentados com a dieta ausente de vitA, não foi observado diferença na produção de Ig. A  $SH_{50}$  não parece ser influenciada pelo nível de vitA do organismo. No entanto, os animais alimentados com os maiores níveis de vitA (10.000 e 20.000) apresentaram a menor atividade, indicando possível toxicidade de tais níveis ou mesmo distúrbios fisiológicos no metabolismo dos peixes resultando em reduzida resistência à doenças. A maior atividade da lisozima foi observada nos animais alimentados com rações suplementadas com 5.000 UI de vitA, enquanto os peixes suplementados com rações suplementadas com 20.000 UI apresentaram os menores valores.

Não foi observada diferença significativa para os parâmetros mortalidade cumulativa, dias para primeira mortalidade e título de anticorpo contra *S. iniae* após 21 dias de desafio experimental dos peixes alimentados com diferentes níveis de vitA (Tabela 7). Os peixes alimentados com a dieta ausente em vitA apresentaram os

menores IHS, enquanto não foi observado diferença significativa entre os demais tratamentos (Tabela 6).

## **Discussão**

Os sinais de deficiência de vitA apresentados neste estudo estão de acordo com aqueles observados para várias espécies de peixes (Halver, 2002; Yang et al., 2008). Embora todos os peixes deficientes tenham apresentado sinais de deficiência de vitA como redução do apetite, hemorragias na pele, nadadeiras e lábios, e deformidade de opérculo e ossos, não se observou animais com exoftalmia e mortalidade, sinais clínicos característicos de deficiência severa de vitA. Sinais de deficiência similares foram observados na tilápia híbrida alimentadas com dietas ausentes em vitA (Hu et al., 2006). No entanto, os sinais clínicos observados por esses autores pareceram ser menos severos que o desta pesquisa.

Neste estudo foi observado, em um curto período de tempo (10 dias), que os animais alimentados com a dieta deficiente em vitA apresentaram sinais de deficiência com redução da taxa de crescimento em apenas 21 dias. Estudo conduzido com linhagem de carpa (*Cyprinus carpio* var. Jian), diferentemente desta pesquisa, observou que após 30 dias de alimentação com a dieta deficiente de vitA os animais começaram a apresentar sinais de deficiência (Yang et al., 2008), entretanto esses sinais não eram tão proeminentes. Este curto período observado para o aparecimento dos primeiros sinais, nos peixes, da presente pesquisa quando comparado a outros estudos deve-se ao fato que neste experimento foram utilizados animais jovens (aproximadamente 5,6 g), os quais não apresentavam grandes quantidades de vitA no fígado, as dietas neste estudo não apresentaram nenhum ingrediente que fosse possível fonte de vitA além da suplementação e as diferenças fisiológicas entre as espécies. Deve-se ressaltar ainda que os estudos publicados com a suplementação de vitA para peixes descrevem sucintamente os sinais de deficiência, com exceção do estudo de Yang et al. (2008).

Os valores de exigência observados para tilápia neste estudo foram similares aos descritos para o bagre do canal *Ictalurus punctatus* (1.000 a 2.000 UI) e para o guppy *Poecilia reticulata* (2.000 a 4.000 UI) (Shim e Tan, 1990; NRC, 1993). Entretanto, são menores daqueles publicados para tilápia. A literatura tem descrito a exigência da tilápia

entre 5.000 e 6.970 UI (Hu et al., 2006; Saleh et al., 1995), enquanto foi obtido neste estudo valores de exigência para o ganho de peso entre 1.543 e 2.058 UI. Essas diferenças podem estar relacionadas às dietas utilizadas nos diferentes estudos visto que no presente estudo nenhum composto com atividade em vitA foi detectado na dieta controle, enquanto no estudo de Hu et al. (2006) a dieta controle continha níveis de vitA (97 UI/kg). Esta pode ser ainda, a explicação pelos autores não terem observado efeitos pronunciados da deficiência desta vitamina.

O reduzido CR é um dos efeitos mais pronunciados da deficiência de vitamina A e tem sido reportado por vários autores em diferentes espécies (Mohamed et al., 2003, Yang et al., 2008, Hernandez et al., 2004; Hernandez et al., 2007). Neste estudo a redução no consumo no final do experimento foi de aproximadamente 75% quando comparado aos demais tratamentos. Este reduzido consumo associado a reduzida eficiência alimentar dos animais deficientes são os principais fatores responsáveis pela drástica queda no ganho de peso.

A eficiência alimentar dos animais alimentados com rações suplementadas com 10.000 e 20.000 UI de vitA foi semelhante à dos animais alimentados com a ração não suplementada na segunda semana experimental. Apesar da ausência de vitA ter determinado sinais visuais de deficiência em curto espaço de tempo, este efeito parece não ser tão rápido para a EA como nos outros parâmetros de desempenho. Ainda, tais diferenças podem estar relacionadas com fatores aleatórios do sistema de cultivo ou fatores relativos ao grupo de animais que propriamente efeito dos tratamentos, visto que os peixes utilizados neste estudo faziam parte de um lote misto de indivíduos machos e fêmeas. Resultados similares para EA foram observados para o *Penaeus monodon* (Shiau e Chen, 2000). Entretanto, estudos com o red sea bream (*Chrysophrys major*) e o Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) não obtiveram efeito significativo da suplementação de vitA na EA (Hernandez et al., 2004; Hernandez et al. 2007). Novamente, a diferença nesses dois últimos estudos deve estar relacionada com o conteúdo de vitA da dieta basal, visto que essas dietas continham ingredientes comumente ricos em vitA como farinha de peixe e óleo de peixe. Estudos de hipervitaminose A em peixes têm demonstrado que as farinhas e óleos de peixes comumente utilizadas na confecção de dietas possuem altos níveis de vitA (Lall e

Parazo, 1995; Dedi et al., 1995), o que pode ter influenciado os resultados desses estudos.

Os dados referentes aos parâmetros hematológicos deste estudo demonstraram claramente o efeito da vitA sobre o sistema hematopoiético, embora poucos dados estejam disponíveis com peixes que avaliem o efeito da suplementação de vitA sobre estes parâmetros. Apesar de alguns nutrientes apresentarem efeito protetor quando administrados em maiores quantidades na dieta, a vitamina A não parece possuir tal efeito. A literatura ressalta que a exigência para a manutenção da saúde é, normalmente, maior que àquela para ótimo crescimento (Blazer, 1992; Barros et al., 2006). Entretanto, foi observado que a exigência para os diferentes parâmetros hematológicos avaliados variou de 1.325 à 2.244 UI de vitA, indicando que, para certos nutrientes, essa assertiva pode não se comprovar. Este resultado foi similar àquele obtido para a truta arco-íris, no qual se observou drástica queda na contagem de eritrócitos (Kitamura et al., 1967). Diferentemente do que era esperado, a exigência para a síntese de eritrócitos aumentou de acordo com o tempo, indicando comportamento atípico deste parâmetro frente a suplementação de vitA. Até o presente momento, este foi o único trabalho que apresenta dados hematológicos em tais condições, o que dificulta a comparação com outros estudos. De maneira geral, todos os parâmetros hematológicos encontraram-se abaixo dos valores de referência considerados normais para a tilápia (Feldman et al., 2000; Hrubec et al., 2000) demonstrando o quadro anêmico dos animais. Resultados similares foram obtidos com o *H. fossilis* alimentados com uma dieta controle e outra deficiente em vitA, no qual os animais apresentaram reduzida taxa de hemoglobina e do número de eritrócitos (Goswami e Dutta, 1991).

Redução da função hematopoiética pode ser observada em estágios iniciais de deficiência de vitA em mamíferos, entretanto no estágio em que os animais encontram-se severamente deficientes os índices hematimétricos encontravam-se dentro da faixa dos valores considerados normais (Mejia et al., 1979). A anemia ocasionada pela deficiência de vitA, nos primeiros estágios, parece estar relacionada com o prejuízo no metabolismo do ferro. Em animais deficientes, tem se observado aumento na absorção de Fe, e na deposição deste nos tecidos (fígado), entretanto com redução da concentração de Fe no plasma, indicando que o ferro encontra-se retido nos estoques

corporais tornando-se indisponível para os demais tecidos (Mejia et al., 1979; Roodenburg et al., 1994; Roodenburg et al., 1996; Strube et al., 2002).

Os índices hematimétricos são cálculos utilizados para determinar e classificar quadros anêmicos. Neste estudo, todos índices foram afetados pela deficiência de vitamina A indicando quadro anêmico severo de anemia megaloblástica. Os quadros anêmicos de deficiência de vitA têm sido descritos, principalmente para mamíferos, sendo descritos quadros similares aos animais com deficiência em ferro (anemia microcítica e hipocrômica) devido a relação da vitA com o metabolismo do Fe. Entretanto, devido ao fato deste ser o primeiro estudo que demonstra os efeitos concretos da deficiência de vitA sobre os parâmetros hematimétricos com peixes fica prejudicada a comparação com outros estudos.

Além dos efeitos sobre os parâmetros hematológicos descritos acima, foi observada redução linear (Figura 1) da fragilidade eritrocitária dos animais quando houve suplementação de vitA às dietas indicando o poder antioxidante desta vitamina na manutenção da integridade das membranas celulares. Apesar deste ser o primeiro estudo a descrever tal efeito desta vitamina em peixes, alguns trabalhos com mamíferos e animais aquáticos têm chamado a atenção para esta propriedade da vitamina A (Cuesta et al., 2002; Fontagné et al., 2006). A alta fragilidade dos eritrócitos observada nos peixes do tratamento controle pode explicar os sintomas nos quais os peixes apresentaram hemorragia quando manejados no final do experimento.

Os dados deste estudo demonstraram que a suplementação de vitamina A parece afetar os parâmetros do sistema imune inato dos peixes, entretanto os resultados não se apresentaram conclusivos. Foi observado maior atividade do *burst* respiratório de macrófagos peritoneais dos animais alimentados com 5.000 e 10.000 UI de vitA/kg da dieta e maior atividade da lisozima nos animais alimentados com a dieta suplementada com 5.000 UI. Apesar de estudos preliminares indicarem possível efeito imunomodulador da vitA em peixes (Thompson et al., 1994, Cuesta et al., 2002; Evans et al., 1984) e esta vitamina determinar resultados promissores quando administrada na dieta de mamíferos, os resultados ainda são escassos e contraditórios com apenas três estudos apresentando efeitos benéficos claros da administração de vitA para peixes (Cuesta et al., 2002; Evans et al., 1984; Yang et al., 2008), entretanto nenhum com a

tilápia. Neste estudo, os efeitos promissores da suplementação de vitA às dietas foram observados principalmente para a resposta imune celular (produção de ânion superóxido). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos para o seabream (Cuesta et al., 2002), enquanto para a truta arco-íris e o salmão do Atlântico não foi observado efeito da suplementação de vitA sobre este parâmetro (Thompson et al., 1994; Thompson et al., 1995).

A proteína sérica apesar de possuir vários componentes do sistema imune inato, é ainda importante parâmetro para avaliar o nível nutricional de um animal (Thomas, 2000). Neste estudo, os animais alimentados com a dieta ausente de suplementação apresentaram o menor valor de proteína sérica, apesar de não ter sido estatisticamente diferente dos animais alimentados com as dietas suplementadas com 2.500 a 10.00 UI de vitA. Isto pode indicar o pior estado em que esses peixes se encontravam.

Apesar de alguns parâmetros do sistema imune terem sido afetados positivamente pela suplementação de vitA, os resultados do desafio com *S. iniae* não demonstraram efeito do tratamento. Apesar de a bactéria ter sido isolada dos peixes infectados demonstrando a eficácia da infecção experimental, os animais deficientes não demonstraram ser afetados pelo desafio. Este resultado permanece obscuro até o presente momento.

De maneira geral, a suplementação de vitamina A influenciou o crescimento dos animais, sendo que os melhores níveis para o ótimo fisiológico variaram de 1.543 a 2.403 UI/kg da dieta; a utilização deste último nível compreende os valores de exigência obtidos para os parâmetros hematológicos. A ausência de vitA reduz drasticamente o desempenho dos animais e os parâmetros hematológicos, possuindo limitado efeito sobre os parâmetros imunológicos e na resistência dos animais à infecção com *S. iniae*, entretanto esta vitamina parece possuir poder antioxidante evidenciado pela reduzida fragilidade eritrocitária. Os peixes deficientes em vitamina A apresentaram reduzido crescimento, hemorragias na pele, lábios e base das nadadeiras levando ao quadro hemorrágico severo após 10 semanas com deformidade óssea e nos opérculos. A anemia observada nos animais deficientes pode ser classificada como macrocítica.

## Referências



- Barros, M.M., Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães, I.G., 2006. Nutrição e saúde de peixes. Pages 1-15 in II Colégio Latino-Americano de Nutrição Animal. Palestra técnica em Manejo e Nutrição de Organismos Aquáticos. April 10-13, 2006, São Paulo, Brazil.
- Blazer, V.S., 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Disease* 1, p. 309-323.
- Brown B.A., 1988. Routine hematology procedures. In: Hematology: Principles and Procedures (ed. by B.A. Brown), pp.7-122. Leo and Febiger, Philadelphia, PA, USA.
- Chen, M.F., Light, T.S., 1994. Specificity of the channel catfish antibody to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquat. Anim. Health* 6, 226–270.
- Cuesta A., Ortuño, J., Rodrigues, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002. Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish Shellf. Immunol.* 13, 279-291.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T., Watanabe, T., 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 133, 135-146.
- Evans, D.L., Graves, S.S., Bazer, V.S., Dawe, D.L., Gratzek, J.B., 1984. Immunoregulation of fish non-specific cytotoxic cell activity by retinol acetate but not poly I:C. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 91-100.
- Ezell, G.H., Sulya, L.L., Dodgen, C.L., 1969. The osmotic fragility of some fish erythrocytes in hypotonic saline. *Comp. Biochem. Physiol.* 28, 409–415.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5.ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Fontagné, S., Bazin, D., Brèque, J., Vachot, C., Bernarde, C., Rouault, T., Bergot, P., 2006. Effects of dietary oxidized lipid and vitamin A on the early development and antioxidant status of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae. *Aquaculture* 257, 400-411.
- Goswami, U.C., Dutta, N.K., 1991. Vitamin A-deficient diet and its effects on certain haematological parameters of *Heteropneustes fossilis* a 3–4-dehydroretinol freshwater fish. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 61, 205-209.

- Guimarães, I.G., Barros, M.M., Orsi, R.C., Pezzato, L.E., Santos, V.G. Desempenho produtivo de tilápias do Nilo alimentadas níveis de vitamina A In: 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 2007, Botucatu. **Anais do 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes.**, 2007.
- Halver J.E., 2002. The vitamins. In: Fish Nutrition, 3rd edn, (ed. by J.E. Halver & R.W. Hardy), pp. 61-141. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Halver, J.E., 1982. The vitamins required for cultivated salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* V.73, p. 43-50.
- Halver, J.E., 1989. The vitamins. In: *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, EUA, p. 32-102., 1989.
- Hernandez, L.H.H.; Teshima, S.; Ishikawa, M.; Koshio, S., 2004. Effects of dietary vitamin A on juvenile Red Sea Bream *Chrysophrys major*. *J World Aquac Soc*, 35, 436-444.
- Hernandez, L.H.H.; Teshima, S.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Tanaka, Y.; Alam, S., 2007. Effects of vitamin A on growth, serum anti-bacterial activity and transaminase activities in the juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 262, 444-450.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis* Hybrid). *Vet. Clin. Pathol.* 29, 7-12.
- Hu, C.-J.; Chen, S.-M.; Pan, C.-H.; Huang, C.-H., 2006. Effects of dietary vitamin A or  $\beta$ -carotene concentrations on growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*  $\times$  *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*. 253, p. 602-607.
- Kitamura, S., Suwa, T., Ohara, S., Nakagawa, K., 1967. Studies on vitamin requirements of rainbow trout: III. Requirement of vitamin A and deficiency symptoms. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 33, 1126-1131.
- Lall, S.P.; Parazo, M.P., 1995. Vitamins in fish and shellfish. In: *Fish and fishery products* (Reuter, A. Ed.). CAB international, Oxon, UK, 1995. pp. 157-186.
- Larsen H.N., 1964. Comparison of various methods of hemoglobin detection of channel catfish blood. *The Progressive Fish-Culturist* 26,11-15.
- Litwack, G., 1955. Photometric determination of lysozyme activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89, 401-403.

- Mejia, L.A., Hodges, R.E., Rucker, R.B., 1979. Clinical signs of anemia in vitamin A-deficient rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 1439-1444.
- Mohamed, J.S.; Sivaram, V.; Christopher, R.; Marian, M.P.; Murugardass, S.; Hussain, M.R., 2003. Dietary vitamin A requirement of juvenile greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). *Aquaculture*, 219, p. 693-701.
- Moren, M.; Opstad, I.; Berntssen, M.H.G.; Zambonino Infante, J.-L.; Hamre, K., 2004. An optimum level of vitamin A supplements for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. *Aquaculture*, 235, p. 587-599.
- NRC (National Research Council), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC, 114 pp.
- Robbins, K.R., Norton, H.W., Baker, D.H., 1979. Estimation of nutrient requirements from growth data. *J. Nutr.* 109, 1710– 1714.
- Roodenburg, A.J.; West, C.E.; Yu, S.; Beynen, A.C., 1994. Comparison between time-dependent changes in iron metabolism of rats as induced by marginal deficiency of either vitamin A or iron. *British Journal of Nutrition*, v. 71, p. 687-699.
- Roodenburg, A.J.C., West, C.E., Hovenier, R., Beynen, A.C., 1996. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Brit. J. Nutr.* 75, 623-636.
- Saleh, G., Eleraky, W., Gropp, J.M., 1995. A short note on the effects of vitamin A hypervitaminosis and hypovitaminosis on health and growth of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Ichthyol. Short communication*. V. 11, p. 382-385.
- Sankaran, K., Gurnani, S., 1972. On the variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian J. Exp. Biochem. Physiol.* 9, 162–165.
- Secombes C.J., 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: *Techniques in Fish Immunology* (ed. by J.S. Stolen, T.C. Fletcher, B.S. Anderson & W.B. Van Muiswinkel), pp.137-144. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA.
- Shiau, S.Y., Chen, Y., 2000. Estimation of the dietary vitamin A requirement of juvenile grass shrimp *Penaeus mondon*. *J. Nutr.* 130, 90-94.
- Shim, K.F., Tan, C.H., 1990. The dietary requirement of vitamin A in guppy (*Poecilia reticulata* Peters). In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), *Proceedings of the Third*

- International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish: the Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture, Toba, Japan, pp. 133– 140.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., 1993. Immunoglobulin levels in fish sera measured by polyethylene glycol and spectrophotometric methods in microtiter plates. In: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, S.L. Kaattari and A.F. Rowley (Editors), *Techniques in Fish Immunology III*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA.
- Stephensen, C.B., 2001. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 21, p. 167-192.
- Strube, Y. N. J.; Beard, J. L.; Ross, A. C., 2002. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *Journal of Nutrition*, v. 132, p. 3607-3615.
- Sunyer, J.O., Tort, L., 1995. Natural and hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 333–345.
- Thomas, J.S., 2000. Overview of plasma proteins. In: In: Feldman, B.F. et al. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia:Lippincott, p.891-898.
- Thompson, I., Choubert, G., Houlihan, D.F., Secombes, C.J., 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture* 133, 91-102.
- Thompson, I.; Fletcher, T.C.; Houlihan, D.F.; Secombes, C.J., 1994. Effect of dietary vitamin A intake on the immunocompetence of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, v. 12, p. 513-523.
- Yang, Q.-h., Zhou, X.-q., Jiang, J., Liu, Y., 2008. Effect of dietary vitamin A deficiency on growth performance, feed utilization and immune responses of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquac. Res.* 39, 902-906.

Tabela 1. Composição percentual e proximal da dieta basal

| Ingredientes                                  | %     |
|---|-------|
| Caseína ausente de vitamina                   | 32,00 |
| Gelatina                                      | 8,00  |
| Amido de milho                                | 33,00 |
| Óleo vegetal (óleo de soja)                   | 6,00  |
| Suplemento mineral <sup>†</sup>               | 4,00  |
| Suplemento vitamínico ausente de Vitamina A * | 1,00  |
| CMC <sup>1</sup>                              | 3,00  |
| Inerte <sup>2</sup>                           | 13,00 |
| Etoxiqum <sup>3</sup>                         | 0,02  |
| <hr/>   |       |
| Análise proximal (base na MS) <sup>4</sup>    | %     |
| Umidade                                       | 9,22  |
| Proteína bruta                                | 32,86 |
| Lipídeos                                      | 5,34  |
| Cinza   | 3,64  |

\*O suplemento vitamínico, diluído em celulose, fornecia a seguinte os seguintes níveis em mg kg<sup>-1</sup> dieta: vitamina D3 (1000 000 UI g<sup>-1</sup>), 2; vitamina K, 10; tiamina, 10; riboflavina, 12; piridoxina, 10; D-pantotenato de cálcio, 32; ácido nicotínico, 80; ácido fólico, 2; vitamina B<sub>12</sub>, 0.01; biotina, 0.2; cloreto de colina, 400.

†O suplemento mineral fornecia os seguintes minerais (mg kg<sup>-1</sup> da dieta): zinco (como ZnSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O), 150; ferro (como FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O), 40; manganês (como MnSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O), 25; cobre (como CuCl<sub>2</sub>), 3; iodo (como KI), 5; cobalto (como CoCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O), 0.05; selênio (como Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), 0.09.

<sup>1</sup> Carboximetil celulose; <sup>2</sup> Celufil; <sup>3</sup> Antioxidante; <sup>4</sup> Analiado.

Tabela 2. Desempenho produtivo de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas contendo níveis de vitamina A durante 10 semanas\*

| Níveis VitA                    | Ganho de peso <sup>†</sup><br>(g) |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    | Consumo de ração <sup>†</sup><br>(g) |                   |                   |                    |                   |       |       |       |       |       | Eficiência alimentar <sup>†</sup> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |                    |                   |                   |                    |                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|                                | 2 sm                              | 4 sm               | 6 sm               | 8 sm               | 10 sm              | 2 sm               | 4 sm               | 6 sm               | 8 sm               | 10 sm              | 2 sm                                 | 4 sm              | 6 sm              | 8 sm               | 10 sm             | 2 sm  | 4 sm  | 6 sm  | 8 sm  | 10 sm | 2 sm                              | 4 sm  | 6 sm  | 8 sm  | 10 sm |       |       |       |       |       |                    |                   |                   |                    |                   |
| 0 UI                           | 4,17 <sup>b</sup>                 | 6,74 <sup>b</sup>  | 8,02 <sup>b</sup>  | 9,00 <sup>b</sup>  | 10,49 <sup>b</sup> | 3,25 <sup>c</sup>  | 5,91 <sup>b</sup>  | 8,23 <sup>b</sup>  | 10,05 <sup>b</sup> | 11,09 <sup>b</sup> | 1,28 <sup>b</sup>                    | 1,14 <sup>b</sup> | 0,97 <sup>b</sup> | 0,89 <sup>c</sup>  | 0,95 <sup>b</sup> | ±0,20 | ±0,39 | ±0,51 | ±0,52 | ±0,75 | ±0,05                             | ±0,19 | ±0,27 | ±0,29 | ±0,43 | ±0,05 | ±0,03 | ±0,04 | ±0,03 | ±0,04 | 1,27 <sup>a</sup>  | 1,21 <sup>a</sup> | 1,21 <sup>a</sup> | 1,19 <sup>ab</sup> | 1,22 <sup>a</sup> |
| 2.500 UI                       | 6,24 <sup>a</sup>                 | 14,64 <sup>a</sup> | 23,78 <sup>a</sup> | 36,50 <sup>a</sup> | 49,85 <sup>a</sup> | 4,53 <sup>b</sup>  | 11,54 <sup>a</sup> | 19,71 <sup>a</sup> | 30,66 <sup>a</sup> | 40,76 <sup>a</sup> | 1,38 <sup>a</sup>                    | 1,27 <sup>a</sup> | 1,21 <sup>a</sup> | 1,19 <sup>ab</sup> | 1,22 <sup>a</sup> | ±0,40 | ±0,96 | ±1,59 | ±1,75 | ±3,04 | ±0,17                             | ±0,46 | ±0,50 | ±1,01 | ±1,70 | ±0,05 | ±0,07 | ±0,05 | ±0,02 | ±0,03 | 1,37 <sup>a</sup>  | 1,26 <sup>a</sup> | 1,24 <sup>a</sup> | 1,23 <sup>a</sup>  | 1,24 <sup>a</sup> |
| 5.000 UI                       | 6,49 <sup>a</sup>                 | 15,14 <sup>a</sup> | 25,05 <sup>a</sup> | 39,75 <sup>a</sup> | 55,11 <sup>a</sup> | 4,77 <sup>ab</sup> | 11,98 <sup>a</sup> | 20,11 <sup>a</sup> | 32,28 <sup>a</sup> | 44,33 <sup>a</sup> | 1,37 <sup>a</sup>                    | 1,26 <sup>a</sup> | 1,24 <sup>a</sup> | 1,23 <sup>a</sup>  | 1,24 <sup>a</sup> | ±0,34 | ±1,17 | ±2,51 | ±2,74 | ±3,29 | 0,05                              | ±0,43 | ±1,08 | ±1,75 | ±2,72 | ±0,05 | ±0,06 | ±0,06 | ±0,02 | ±0,01 | 1,34 <sup>ab</sup> | 1,25 <sup>a</sup> | 1,12 <sup>a</sup> | 1,12 <sup>b</sup>  | 1,16 <sup>a</sup> |
| 10.000 UI                      | 6,52 <sup>a</sup>                 | 15,39 <sup>a</sup> | 24,53 <sup>a</sup> | 37,44 <sup>a</sup> | 51,79 <sup>a</sup> | 4,86 <sup>a</sup>  | 12,24 <sup>a</sup> | 22,31 <sup>a</sup> | 33,61 <sup>a</sup> | 44,84 <sup>a</sup> | 1,34 <sup>ab</sup>                   | 1,25 <sup>a</sup> | 1,12 <sup>a</sup> | 1,12 <sup>b</sup>  | 1,16 <sup>a</sup> | ±0,38 | ±1,23 | ±1,83 | ±1,04 | ±3,33 | ±0,12                             | ±0,79 | ±4,14 | ±4,15 | 3,94  | ±0,04 | ±0,03 | ±0,18 | ±0,13 | ±0,10 | 1,32 <sup>ab</sup> | 1,23 <sup>a</sup> | 1,21 <sup>a</sup> | 1,20 <sup>ab</sup> | 1,21 <sup>4</sup> |
| 20.000 UI                      | 6,40 <sup>a</sup>                 | 14,73 <sup>a</sup> | 24,80 <sup>a</sup> | 39,21 <sup>a</sup> | 53,21 <sup>a</sup> | 4,86 <sup>a</sup>  | 11,90 <sup>a</sup> | 20,39 <sup>a</sup> | 32,60 <sup>a</sup> | 44,17 <sup>a</sup> | 1,32 <sup>ab</sup>                   | 1,23 <sup>a</sup> | 1,21 <sup>a</sup> | 1,20 <sup>ab</sup> | 1,21 <sup>4</sup> | ±0,38 | ±1,37 | ±2,78 | ±4,03 | ±5,24 | ±0,32                             | ±0,97 | ±1,67 | ±2,74 | ±3,74 | ±0,01 | ±0,02 | ±0,05 | ±0,03 | ±0,03 | 1,20 <sup>ab</sup> | 1,23 <sup>a</sup> | 1,21 <sup>a</sup> | 1,20 <sup>ab</sup> | 1,21 <sup>4</sup> |
| Platô (UI de vitA/kg da dieta) | 1.685                             | 2.058              | 1.543              | 1.812              | 1.659              | 2.403              | 2.122              | 2.157              | 2.154              | 2.190              | SP                                   | SP                | SP                | SP**               | 1.753             |       |       |       |       |       |                                   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |                    |                   |                   |                    |                   |

\* Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 0,05.

\*\* SP: efeito LRP não significativo.

† Médias representam os valores de 4 tanques por tratamento.

Tabela 3. Valores médios ( $\pm$ SD) para número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina e número de leucócitos de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas contendo níveis de vitamina A\*

| Níveis de VitA                 | Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ ) <sup>†</sup> |                                 |                                 | Hematócrito (%) <sup>†</sup>     |                                  |                                  | Hemoglobina (g/dL) <sup>‡</sup> |                                 |                                 | Leucócitos ( $10^7/\mu\text{L}$ ) <sup>‡</sup> |                                 |                                  |
|--------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|----------------------------------|
|                                | 4 sm  | 8 sm                            | 10 sm                           | 4 sm                             | 8 sm                             | 10 sm                            | 4 sm                            | 8 sm                            | 10 sm                           | 4 sm   | 8 sm                            | 10 sm                            |
| 0 UI                           | 0,55 <sup>c</sup><br>$\pm 0,21$                 | 0,94 <sup>b</sup><br>$\pm 0,14$ | 0,58 <sup>b</sup><br>$\pm 0,14$ | 17,63 <sup>b</sup><br>$\pm 0,48$ | 18,00 <sup>b</sup><br>$\pm 1,22$ | 16,37 <sup>b</sup><br>$\pm 0,95$ | 4,82 <sup>b</sup><br>$\pm 0,89$ | 4,19 <sup>b</sup><br>$\pm 0,28$ | 5,15 <sup>b</sup><br>$\pm 1,09$ | 2,20 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,53$               | 1,37 <sup>b</sup><br>$\pm 0,11$ | 1,11 <sup>b</sup><br>$\pm 0,13$  |
| 2.500 UI                       | 1,39 <sup>b</sup><br>$\pm 0,19$                 | 1,78 <sup>a</sup><br>$\pm 0,05$ | 1,81 <sup>a</sup><br>$\pm 0,20$ | 31,63 <sup>a</sup><br>$\pm 2,49$ | 29,62 <sup>a</sup><br>$\pm 2,29$ | 33,62 <sup>a</sup><br>$\pm 1,89$ | 7,36 <sup>a</sup><br>$\pm 0,84$ | 6,64 <sup>a</sup><br>$\pm 1,13$ | 8,06 <sup>a</sup><br>$\pm 0,45$ | 1,97 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,37$               | 1,50 <sup>b</sup><br>$\pm 0,11$ | 1,96 <sup>a</sup><br>$\pm 0,21$  |
| 5.000 UI                       | 1,88 <sup>a</sup><br>$\pm 0,06$                 | 1,79 <sup>a</sup><br>$\pm 0,30$ | 2,03 <sup>a</sup><br>$\pm 0,16$ | 34,12 <sup>a</sup><br>$\pm 1,55$ | 28,50 <sup>a</sup><br>$\pm 0,96$ | 32,92 <sup>a</sup><br>$\pm 3,07$ | 7,31 <sup>a</sup><br>$\pm 0,13$ | 6,31 <sup>a</sup><br>$\pm 0,22$ | 8,06 <sup>a</sup><br>$\pm 0,49$ | 1,78 <sup>b</sup><br>$\pm 0,26$                | 1,31 <sup>b</sup><br>$\pm 0,16$ | 1,53 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,16$ |
| 10.000 UI                      | 1,57 <sup>b</sup><br>$\pm 0,34$                 | 1,82 <sup>a</sup><br>$\pm 0,16$ | 1,93 <sup>a</sup><br>$\pm 0,06$ | 31,87 <sup>a</sup><br>$\pm 1,31$ | 29,62 <sup>a</sup><br>$\pm 1,03$ | 32,58 <sup>a</sup><br>$\pm 2,36$ | 7,03 <sup>a</sup><br>$\pm 1,20$ | 6,59 <sup>a</sup><br>$\pm 0,20$ | 7,79 <sup>a</sup><br>$\pm 0,76$ | 2,53 <sup>a</sup><br>$\pm 0,67$                | 2,22 <sup>a</sup><br>$\pm 0,33$ | 1,63 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,50$ |
| 20.000 UI                      | 1,54 <sup>b</sup><br>$\pm 0,10$                 | 2,00 <sup>a</sup><br>$\pm 0,30$ | 2,04 <sup>a</sup><br>$\pm 0,24$ | 34,87 <sup>a</sup><br>$\pm 3,27$ | 29,25 <sup>a</sup><br>$\pm 1,04$ | 30,39 <sup>a</sup><br>$\pm 4,38$ | 7,51 <sup>a</sup><br>$\pm 1,30$ | 6,71 <sup>a</sup><br>$\pm 0,61$ | 7,84 <sup>a</sup><br>$\pm 0,68$ | 2,41 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,21$               | 2,33 <sup>a</sup><br>$\pm 0,44$ | 1,60 <sup>ab</sup><br>$\pm 0,44$ |
| Platô (UI de vitA/kg da dieta) | 1.590   | 1.762                           | 2.244                           | 2.226                            | 1.688                            | 1.325                            | SP                              | 1.726                           | 1.665                           | SP**   | SP                              | SP                               |

\* Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes à  $P < 0,05$

\*\*SP: efeito LRP não significativo.

† Médias representam os valores de duas determinações por peixe, três peixes por aquário e quatro aquários por tratamento.

‡ Médias representam os valores de uma determinação por peixe, três peixes por aquário e quatro tanques por tratamento.

Tabela 4. Volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e fragilidade eritrocitária (FE) de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas contendo níveis de vitamina A\*

| Níveis de vitA | VCM† (fL)                      |                                |                               |                              | CHCM† (%)                   |                             |                               |       | FE† (% hemólise) |       |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------|------------------|-------|
|                | 4 sm                           |                                | 10 sm                         |                              | 4 sm                        |                             | 8 sm                          |       | 10 sm            |       |
|                | 4 sm                           | 8 sm                           | 4 sm                          | 8 sm                         | 4 sm                        | 8 sm                        | 8 sm                          | 10 sm | 10 sm            | 10 sm |
| 0 UI           | 361,28 <sup>a</sup><br>±140,44 | 194,38 <sup>a</sup><br>±33,35  | 297,29 <sup>a</sup><br>±93,41 | 27,41 <sup>a</sup><br>±5,31  | 23,36 <sup>a</sup><br>±2,06 | 31,77 <sup>a</sup><br>±8,53 | 63,83 <sup>a</sup><br>±4,61   |       |                  |       |
| 2.500 UI       | 230,20 <sup>b</sup><br>±24,69  | 166,52 <sup>ab</sup><br>±10,19 | 186,94 <sup>b</sup><br>±17,19 | 23,26 <sup>ab</sup><br>±1,78 | 22,36 <sup>a</sup><br>±2,60 | 23,99 <sup>b</sup><br>±0,86 | 43,34 <sup>b</sup><br>±8,79   |       |                  |       |
| 5.000 UI       | 180,92 <sup>b</sup><br>±9,72   | 161,88 <sup>ab</sup><br>±25,85 | 163,09 <sup>b</sup><br>±20,03 | 21,46 <sup>b</sup><br>±1,27  | 22,18 <sup>a</sup><br>±1,45 | 24,65 <sup>b</sup><br>±2,48 | 30,37 <sup>bc</sup><br>±7,09  |       |                  |       |
| 10.000 UI      | 209,16 <sup>b</sup><br>±38,45  | 163,23 <sup>ab</sup><br>±12,53 | 168,96 <sup>b</sup><br>±15,94 | 22,01 <sup>b</sup><br>±3,20  | 22,28 <sup>a</sup><br>±1,11 | 24,02 <sup>b</sup><br>±3,03 | 29,21 <sup>bc</sup><br>±21,48 |       |                  |       |
| 20.000 UI      | 225,87 <sup>b</sup><br>±10,16  | 149,02 <sup>b</sup><br>±27,80  | 149,19 <sup>b</sup><br>±12,48 | 21,50 <sup>b</sup><br>±2,68  | 22,92 <sup>a</sup><br>±1,61 | 25,96 <sup>b</sup><br>±1,57 | 18,86 <sup>c</sup><br>±2,92   |       |                  |       |

\* Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes à  $P < 0.05$

† Médias representam o valores de uma determinação por peixe, três peixes por aquário e quatro tanques por tratamento.



Tabela 5. Valores médios ( $\pm$  SD) para produção de ânion superóxido, proteína sérica, imunoglobulina sérica (Ig), atividade da via alternativa do complemento (SH<sub>50</sub>) e atividade da lisozima no soro de tilápias do Nilo alimentadas com dietas purificadas contendo níveis de vitamina A durante 10 semanas\*

| Níveis de VitA | Produção de anion superóxido (DO 630nm) <sup>†</sup> | Proteína sérica (mg/mL) <sup>‡</sup> | Ig (mg/mL) <sup>‡</sup>    | SH <sub>50</sub> (unidades/mL) <sup>‡</sup> | Lisozima (µg/mL) <sup>‡</sup> |
|----------------|--|--------------------------------------|----------------------------|---|-------------------------------|
| 0 UI           | 0,069 <sup>b</sup><br>±0,04                          | 38,95 <sup>b</sup><br>±1,02          | 4,41 <sup>a</sup><br>±1,66 | 198,62 <sup>ab</sup><br>±45,68              | 53,81 <sup>bc</sup><br>±8,16  |
| 2.500 UI       | 0,063 <sup>b</sup><br>±0,05                          | 42,05 <sup>ab</sup><br>±1,53         | 4,82 <sup>a</sup><br>±0,99 | 174,15 <sup>ab</sup><br>±19,69              | 41,00 <sup>cd</sup><br>±9,00  |
| 5.000 UI       | 0,226 <sup>a</sup><br>±0,12                          | 42,41 <sup>ab</sup><br>±1,03         | 4,66 <sup>a</sup><br>±1,21 | 220,25 <sup>a</sup><br>±5,78                | 85,75 <sup>a</sup><br>±7,84   |
| 10.000 UI      | 0,230 <sup>a</sup><br>±0,06                          | 41,85 <sup>ab</sup><br>±2,71         | 4,33 <sup>a</sup><br>±0,16 | 137,96 <sup>b</sup><br>±15,12               | 61,30 <sup>b</sup><br>±7,45   |
| 20.000 UI      | 0,078 <sup>b</sup><br>±0,06                          | 43,72 <sup>a</sup><br>±2,46          | 5,43 <sup>a</sup><br>±2,51 | 144,99 <sup>b</sup><br>±52,22               | 33,81 <sup>d</sup><br>±15,34  |

\* Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes à  $P < 0.05$

<sup>†</sup> Médias representam os valores de quarto tanques por tratamento.

<sup>‡</sup> Médias representam os valores de duas determinações por peixe, quatro peixes por aquário e quatro aquários por tratamento.

Tabela 6. Conteúdo de vitamina A das dietas e índice hepatossômico (IHS) de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis de vitamina A durante 10 semanas\*

| Níveis de VitA | Dieta (UI/kg) | IHS (%)                    |
|----------------|---------------|----------------------------|
| 0 UI           | 0             | 1,27 <sup>b</sup><br>±0,17 |
| 2.500 UI       | 1.948         | 1,78 <sup>a</sup><br>±0,08 |
| 5.000 UI       | 4.023         | 1,58 <sup>a</sup><br>±0,22 |
| 10.000 UI      | 8.666         | 1,53 <sup>a</sup><br>±0,15 |
| 20.000 UI      | 17.534        | 1,65 <sup>a</sup><br>±0,10 |

\* Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes à  $P < 0.05$

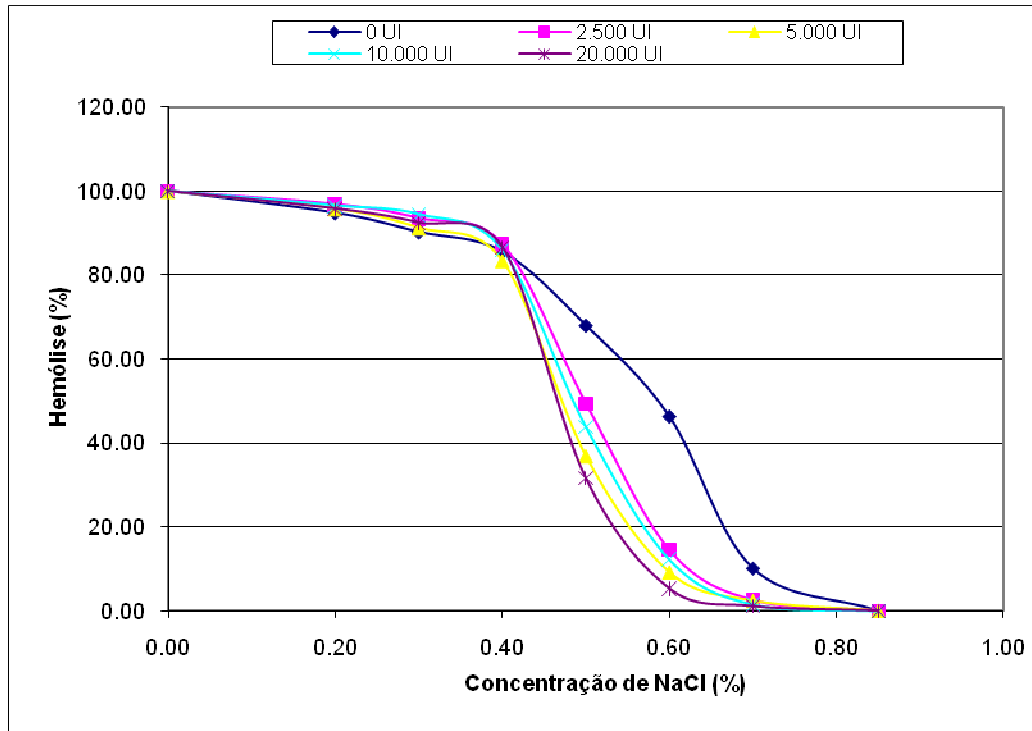
<sup>†</sup> Médias ( $\pm$ SD) representam os valores de quarto tanques por tratamento.

Tabela 7. Número médio de dias para a primeira mortalidade, mortalidade cumulativa e título de anticorpo de tilápias do Nilo após 21 dias de desafio com *Streptococcus iniae*\*

| Níveis de VitA | Dias para primeira<br>Mortalidade | Mortalidade<br>cumulativa (%) | Título de anticorpo<br>(log <sub>10</sub> ) |
|----------------|-----------------------------------|-------------------------------|---|
| 0 UI           | 2,1<br>±0,5                       | 19,4<br>±11,56                | 1,85<br>± 0,78                              |
| 2.500 UI       | 1,4<br>±0,5                       | 20,8<br>±8,33                 | 1,90<br>± 0,42                              |
| 5.000 UI       | 1,7<br>±0,9                       | 31,9<br>±23,73                | 1,92<br>± 0,30                              |
| 10.000 UI      | 1,2<br>±0,3                       | 27,8<br>±7,86                 | 1,65<br>± 0,37                              |
| 20.000 UI      | 1,2<br>±0,3                       | 29,2<br>±9,49                 | 1,90<br>± 0,24                              |

\*Valores são médias (±SD) de quatro repetições por tratamento. Nenhuma diferença foi observada entre as médias dos tratamentos ao nível de  $P > 0.05$ .

Figura 1. Fragilidade eritrocitária de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis de vitamina A



## IMPLICAÇÕES

- ✓ A utilização de níveis adequados de vitamina A se torna prática importante na indústria de rações, visto seu importante papel na manutenção da saúde e desenvolvimento dos peixes. A exigência para a tilápia do Nilo com base no ótimo fisiológico está em torno de 2.500 UI/kg da dieta, entretanto deve-se considerar a estabilidade da fonte da vitamina após o processamento da dieta de forma que este nível esteja presente no produto final. Desta forma, com base no estudo de Barrows et al. (2008), recomenda-se a suplementação de vitamina A de duas a três vezes o valor da exigência em dietas extrusadas de modo a obter níveis finais na ração próximos da exigência nutricional;
- ✓ O excesso de vitamina A pode ocasionar problemas metabólicos a longo prazo. Desta forma, a utilização de níveis elevados de vitA (acima de 10.000 UI) em dietas para peixes pelas indústrias de ração deve ser visto com cautela, principalmente quando se fizer uso de dietas peletizadas;
- ✓ Com base nos resultados do presente estudo, vê-se a necessidade de novas pesquisas que elucidem de forma o metabolismo e os efeitos desta vitamina em peixes, assim como sua interação com o metabolismo do ferro e seu efeito antioxidante.