

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/02/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Desempenho produtivo e caracterização da resposta hemato-imunológica induzida por nucleotídeo em tilápia-do-Nilo desafiada com *Streptococcus agalactiae* sorotipo não tipável

Evandro Bilha Moro

Engenheiro de Pesca

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Desempenho produtivo e caracterização da resposta hemato-imunológica induzida por nucleotídeo em tilápia-do-Nilo desafiada com *Streptococcus agalactiae* sorotipo não tipável

Evandro Bilha Moro
Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2022

M867d Moro, Evandro Bilha
Desempenho produtivo e caracterização da resposta hemato-
imunológica induzida por nucleotídeo em tilápia-do-Nilo desafiada com
Streptococcus agalactiae sorotipo não tipável / Evandro Bilha Moro. --
Jaboticabal, 2022
x, 105 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2022

Orientadora: Fabiana Pilarski

Banca examinadora: João Fernando Albers Koch, Fernando Yugo
Yamamoto, Giovani Sampaio Gonçalves, Altevir Signor

Bibliografia

1. Aquicultura. 2. Bacteriose. 3. Imunoestimulante. 4. Nucleotídeo. 5.
Nutrição. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desempenho produtivo e caracterização da resposta hemato-imunológica induzida por nucleotídeo em tilápia-do-Nilo desafiada com *Streptococcus agalactiae* sorotipo não tipificável

AUTOR: EVANDRO BILHA MORO

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Dr. JOÃO FERNANDO ALBERS KOCH (Participação Virtual)

Pesquisa e Desenvolvimento / Biorigin, Lençóis Paulista-SP

Prof. Dr. FERNANDO YUGO YAMAMOTO (Participação Virtual)

Department of Ecology and Conservation Biology / Texas A&M University

Pesquisador Científico II GIOVANI SAMPAIO GONCALVES (Participação Virtual)

Divisão de Pesca do Interior, Secão de Aquicultura e Controle / Instituto de Pesca, São José do Rio Preto-SP

Pesquisador ALTEVIR SIGNOR (Participação Virtual)

Centro de Engenharias e Ciências Exatas / UNIOESTE, Toledo-PR

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização da resposta hemato-imunológica induzida por nucleotídeo em tilápia-do-Nilo desafiada com *Streptococcus agalactiae***", protocolo nº 004605/19, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 11 de abril de 2019.

Vigência do Projeto	06/05/2019 a 12/07/2019
Espécie / Linhagem	Tilápia-do-Nilo
Nº de animais	1610
Peso / Idade	20 gramas/ 50 dias e 300 gramas/ 120 dias
Sexo	Masculino
Origem	Piscicultura comercial do estado de São Paulo

Jaboticabal, 11 de abril de 2019.


Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO
Vice-Coordenador – CEUA

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora de Aparecida pela devoção e graças recebidas!

À minha família, meu Pai Ademir, minha Mãe Dulcinéia e minhas irmãs Gislaine e Daniele, por todo apoio e suporte prestados, e que mesmo pela distância sempre estiveram presentes.

A minha orientadora Prof.^a Fabiana Pilarski, pela acolhida em seu laboratório e integração a equipe. Agradeço a confiança em mim depositada para execução dos trabalhos desenvolvidos ao longo do doutorado, a compreensão e por fazer parte deste crescimento profissional.

Ao meu orientador de graduação e mestrado Prof.^o Altevir Signor, pelo incentivo a carreira acadêmica e indicação para realização deste doutorado.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos pelo auxílio nas análises da presente tese e de diversos outros trabalhos que executamos durante esse período do doutorado. Em especial a Suzana, Karen, Daiane e Inácio que ajudaram muito neste trabalho. Obrigada pela amizade de todos vocês.

A Suely Marlene Rodrigues da Piscicultura Projeto Peixes, pela doação dos peixes, todo suporte, carinho e atenção que nos prestou na execução deste trabalho.

Agradeço aos alunos e professores que pude conhecer entre outros departamentos da Unesp, os quais auxiliaram e contribuíram com esta pesquisa. A Prof.^a Margarida Maria Barros, por ceder o espaço e auxílio do Pedro e do Igor na confecção das rações processadas no Aquanutri. Ao Prof.^o Dalton José Carneiro por ajudar com a formulação da ração, ceder o espaço e ao Dênis que auxiliou nas análises realizadas no laboratório de nutrição. A Prof.^a Elizabeth Criscuolo Urbinati e equipe do laboratório de fisiologia de peixes, por ceder o espaço para realização de diversas análises apresentadas nesse trabalho. Em especial ao Allan por auxiliar nas análises realizadas no laboratório, além do companheirismo e parceria fora do ambiente de trabalho. A Prof.^a Lizandra Amoroso e Prof.^a Silvana Artoni do Departamento de morfologia e ao Jonathan

pelo auxílio e execução do aparelho DXA e ao Prof. Fernando Yamamoto da Universidade do Mississippi, EUA pela colaboração e auxílio prestado nas análises estatísticas.

Ao João Fernando Albers Koch pela parceria firmada, que tornou possível a execução deste trabalho com apoio e financiamento da Biorigin.

Ao pesquisador Dr. Giovani Sampaio Gonçalves e ao Instituto de Pesca de São José do Rio Preto, pelo fornecimento de ingredientes e processamento das rações utilizadas nesse trabalho.

Aos funcionários do Caunesp Valdecir, Perereca (Márcio), Luiz e Donizete, Silvinha e zeladoras Elaine, Lucia e Suerli, que contribuíram de forma direta e indireta em algumas etapas de desenvolvimento do trabalho e pela amizade ao longo do doutorado.

Aos meus colegas de turma Bruno e Ricácio, pela parceria desde o mestrado e mantivemos, mesmo a distância, ao longo do doutorado.

Ao *homemate* Rubens pela amizade nos momentos externos e pela parceria em atividades dentro do Caunesp.

A República Xicreti, que além de moradia por um período, se tornou uma família em Jaboticabal, e em especial a Bell, administradora da casa e que temos grande carinho.

E aos amigos que fiz no Mountain Bike, os quais proporcionaram grandes momentos de descontrações e conhecimento regional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – pela concessão da bolsa de estudos (processo nº 140837/2018-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a suplementação de RNA, como fonte de nucleotídeos dietético, incluído antes e após a extrusão na dieta da tilápia-do-Nilo e seu efeito nos parâmetros hematológico, bioquímico e imunológico antes e após o desafio contra *Streptococcus agalactiae* não tipável. O estudo foi conduzido em três etapas. No primeiro experimento foi avaliada a incorporação de 0, 37, 75 e 150 mg kg⁻¹ de RNA na ração antes da extrusão. Os peixes foram alimentados por 30 dias com as dietas e realizadas biometrias em 0, 15 e 30 dias. Ao final do período experimental, oito peixes de cada unidade experimental foram realocados em uma unidade para inoculação da bactéria inativada. Os demais peixes foram desafiados com cepa de *S. agalactiae* viva. Os resultados deste primeiro experimento não foram promissores, pois a porcentagem de nucleotídeos disponíveis na dieta foi inferior ao recomendado para suprir a demanda pelos peixes, portanto, novos estudos foram realizados. No segundo experimento, foram preparadas dietas contendo 0, 250, 500 e 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo, incorporado na dieta de dois modos, antes da extrusão e após a extrusão por *coating* utilizando-se CMC. Os peixes foram alimentados por 90 dias com essas dietas e as coletas foram realizadas em 0, 30, 60 e 90 dias. Ao final do período experimental, nove peixes de cada grupo experimental foram realocados para uma unidade para inoculação da bactéria inativada. Os demais peixes foram desafiados com cepa *S. agalactiae* viva. A suplementação dietética de nucleotídeo em ambos os métodos de incorporação foi promissora durante os 90 dias de alimentação, todavia, após o desafio o imunomodulador pode ter apresentado efeito adverso (sobrecarga) ao sistema imune devido a exposição prolongada à dieta suplementada. No terceiro experimento, foram utilizadas as mesmas dietas do segundo experimento. Os peixes foram alimentados por 30 dias com as dietas experimentais e o desempenho produtivo avaliado. Ao final dos 30 dias, os peixes foram desafiados com *S. agalactiae* vivo. Os peixes alimentados com a dieta contendo 1.000 mg kg⁻¹ de RNA como fonte de nucleotídeos dietéticos apresentaram melhor desempenho produtivo em crescimento e ganho em peso, contudo, os níveis de inclusão e métodos não apresentaram diferença significativa para sobrevivência após o desafio bacteriano. A suplementação dietética de nucleotídeo está intimamente relacionada com a fase de vida e tempo de administração na dieta para peixes. A inclusão de 500 a 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo antes ou após a extrusão ocasiona melhora no

desempenho produtivo e na resposta imunológica da tilápia-do-Nilo, desde que não seja administrado por período superior a 90 dias.

Palavras-chave: aquicultura, bacteriose, imunidade inata, peixe, RNA.

Revisão de literatura

Aquicultura: cenário atual

Com a demanda por proteína de origem animal crescente, e um volume cada vez maior de produção pela aquicultura em todo o mundo, exerce-se uma pressão para maximizar a eficiência da produção e ao mesmo tempo garantir a sustentabilidade dos sistemas produtivos (BOWYER et al., 2019). A produção de alimentos de origem terrestre é limitada em espécies, já a produção de organismos aquáticos – aquicultura – é o setor de produção de alimentos com maior diversificação, inclui plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e de maior diversidade, os peixes (SUBASINGHE, 2005).

Durante os últimos 20 anos, a aquicultura global obteve sucesso e continua a aumentar sua produção, ao mesmo tempo que atinge os objetivos essenciais de sustentabilidade ambiental, econômica e social (BOYD et al., 2020). A taxa de crescimento médio anual da aquicultura no período de 2001 – 2018 foi de 5,3% (FAO, 2020). Apesar de nosso planeta ser coberto por água salgada (70%), a produção aquícola de espécies de peixes de água doce representa 85,7% e, as principais espécies incluem carpas, tilápias e bagres (TACON, 2018).

O mercado aquícola é dominado pela Ásia, liderado pela China, o maior produtor de peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas. O Brasil, ranqueado em 13º maior produtor de organismos aquáticos, tem a produção liderada pela tilápia, que representou em 2020, 60,6% do total (802.930 t) da piscicultura (PEIXE BR 2021).

O aprimoramento de novas tecnologias e técnicas de produção intensiva tem sido aplicada a fim de aumentar a produtividade aquícola (KORD et al., 2021; ALIABAD et al., 2022). A tecnificação dos sistemas de produção demanda estratégias para manter a qualidade da água sem causar estresse aos animais e prejuízo ao ambiente, o que demanda um manejo adequado e o uso de rações altamente eficientes (RODRIGUEZ-ESTRADA e RANZANI-PAIVA, 2019).

A seleção de espécies para a piscicultura comercial se baseia em requisitos como carne de excelente qualidade, facilidade de adaptação aos diferentes sistemas produtivos e, em alguns casos, espécies propícias à pesca esportiva também são preferíveis (RIBEIRO et al., 2017). Com

características que se enquadram nesse perfil, a tilápia tem conquistado o mundo tanto na produção como no paladar dos consumidores.

Conclusão

A suplementação de 1.000 mg kg⁻¹ de RNA como fonte de nucleotídeos incorporado à dieta antes da extrusão e fornecida por 30 dias proporcionou maior crescimento e ganho em peso em juvenis de tilápia-do-Nilo. Todavia, o aditivo não foi capaz de aumentar a sobrevivência da tilápia-do-Nilo após infecção experimental com *Streptococcus agalactiae* não tipável.

Referências

- AMENYOGBE, E.; CHEN, G.; WANG, Z.; HUANG, J.; HUANG, B.; LI, H. The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions.: a review. *Aquaculture International*, v.28, p.1017–1041. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00509-0>.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 18^a ed. Gaithersburg, Maryland, USA, 2005.
- ASADUZZAMAN, M.; IKEDA, D.; ABOL-MUNAFI, A. B.; BULBUL, M.; ALI, M. E.; KINOSHITA, S.; WATABE, S.; KADER, M. A. Dietary supplementation of inosine monophosphate promotes cellular growth of muscle and upregulates growth-related gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. v.468, p.297-306. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.033>
- ASENCIOS, Y. O.; SÁNCHEZ, F. B.; MENDIZÁBAL, H. B.; PUSARI, K. H.; ALFONSO, H. O.; SAYÁN, A. M.; FIGUEIREDO, M. A. P.; MANRIQUE, W. G.; BELO, M. A. A.; CHAUPE, N. S. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports*, v.4 p. 74-79. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.06.002>
- BAYLISS, S. C.; VERNER-JEFFREYS, D. W.; BARTIE, K. L.; AANENSEN, D. M.; SHEPPARD, S. K.; ADAMS, A.; FEIL, E. J. The promise of whole genome pathogen sequencing for the molecular epidemiology of emerging aquaculture pathogens. *Frontiers in Microbiology*, v.8, p.1–18. 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00121>.
- BORDA, E.; MARTINEZ-PUIG, D.; CORDOBA, X. A balanced nucleotide supply makes sense. *Feed Mix*. v.11p.24 - 26. 2003.
- CAO, J.; LIU, Z.; ZHANG, D.; GUO, F.; GAO, F.; WANF, M.; YI, M; LU, M. Distribution and localization of *Streptococcus agalactiae* in different tissues of artificially infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 546. 737370. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737370>
- CHEN, S. L. Genomic Insights Into the Distribution and Evolution of Group B *Streptococcus*. *Frontiers in Microbiology*, v.10, p.1447. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01447>.
- De LIMA, S. A.; PDREIRA, A. C. O.; De FREITAS, J. M. A.; DALMASO, A. C. S.; CHIELLA, R. J.; MEURER, F.; ROMÃO, S.; BOMBARDELLI, R. A. Diets containing purified nucleotides reduce oxidative stress, interfere with reproduction, and promote growth in Nile tilapia females. *Aquaculture*. v.528, p.735509. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735509>.
- ESTAIANO de REZENDE, R. A.; SOARES, M. P.; SAMPAIO, F. G.; CARDPSP, I. L.; ISHIKAWA, M. M.; DALLAGO, B. S. L.; RANTIN, F. T.; DUARTE, M. C. T. Phytobiotics blend as a dietary supplement for Nile tilapia health improvement. *Fish and Shellfish Immunology* v.114, p.293–300, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.010>
- GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.56 (Suppl. 3), S1–S4. 2002.

GUO, Z.; LI, J.; RAN, C.; WANG, A.; XIE, M.; XIE, Y.; DING, Q.; ZHANG, Z.; YANG, Y.; DUAN, M.; ZHOU, Z. Dietary nucleotides can directly stimulate the immunity of zebrafish independent of the intestinal microbiota. *Fish and Shellfish Immunology*, v.86, p.1064-1071. 2019.

HOSSAN, M. S.; KOSHIO, S.; KESTEMONT, P. Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, v.12, p.1028-1053. 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12370>.

IRKIN, L. C.; YIGIT, M. The use of garlic (*Allium sativum*) meals as a natural feed supplement in diets for european seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, v.2, n.3, p.128–141. 2015.

KADER, M. A.; BULBUL, M.; ABOL-MUNAFI, A. B.; ASADUZZAMAN, M.; MIAN, S.; NOODRIN, N. B. M.; ALI, M. E.; HOSSAIN, M.; KOSHIO, S. Modulation of growth performance, immunological responses and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) by supplementing dietary inosine monophosphate. *Aquaculture Reports*, v.10, p.23-31. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.03.003>

LI, P.; GATLIN III, D. M. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture*, v.251, p.141–152. 2006.

Liu, L., Lu, D.Q., Xu, J., Luo, H.-L., Li, A.-X., Development of attenuated erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture. *J. Fish Dis.* 42, 693–701. 2019. <https://doi.org/10.1111/jfd.12977>

OBIRIKORANG, K. A.; AMISAG, S.; FIALOR, S. C.; SKOV, P. V. Effects of dietary inclusions of oilseed meals on physical characteristics and feed intake of diets for the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Reports*, v.1, p.43-49. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.01.002>

REDA, R. M.; SELIM, K. M.; MAHMOUD, R.; EL-ARABY, I. E. Effect of dietary yeast nucleotide on antioxidant activity, non-specific immunity, intestinal cytokines, and disease resistance in Nile Tilapia. *Fish & Shellfish Immunology*, v.80, p.281-290. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.016>.

SETIJANINGSIH, L.; SETIADI, E.; TAUFIK, I.; MULYASARI. The effect of garlic *Allium sativum* addition in feed to the growth performance and immune response of tilapia *Oreochromis niloticus*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, v.744, p.012072. 2021. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/744/1/012072>.

SHIAU, S.; GABAUDAN, J.; LIN, Y. Dietary nucleotide supplementation enhances immune responses and survival to *Streptococcus iniae* in hybrid tilapia fed diet containing low fish meal. *Aquaculture Reports*, v. 2, p.77–81. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.08.002>.

TAHMASEBI-KOBYANI, A.; KEYVANSHOKOOH, S.; NEMATOLLAHI, A.; MAHMOUDI, N.; PASHA-ZANOOSI, H. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology*, v.30, n.1, p.189-193. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.005>.

TAVARES, G. C.; PEREIRA, F. L.; BARONY, G. M.; REZENDE, C. P.; DA SILVA, W. M.; DE SOUZA, G. H. M. F.; VERANO-BRAGA, T.; AZEVEDO, V. A. C.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Delineation of the pan-proteome of fishpathogenic *Streptococcus*

agalactiae strains using a label-free shotgun approach. *BMC Genomics*, v. 20, n. 11, p. 1 – 22. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5423-1>

WELKER, T. L.; LIM, C.; AKSOY, M. Y.; KLESIUS, P. H. Effects of dietary supplementation of a purified nucleotide mixture on immune function and disease and stress resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture Research*, v.42, p.1878–1889. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02794.x>