



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



BETA-GLUCANO E MANANOLIGOSSACARÍDEO NA ALIMENTAÇÃO DE
TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) SOBRE AS RESPOSTAS
HEMATOLÓGICA, IMUNOLÓGICA E DESEMPENHO PRODUTIVO

NYCOLAS LEVY PEREIRA

ZOOTECNISTA

JABOTICABAL - SÃO PAULO

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

BETA-GLUCANO E MANANOLIGOSSACARÍDEO NA ALIMENTAÇÃO DE
TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) SOBRE AS RESPOSTAS
HEMATOLÓGICA, IMUNOLÓGICA E DESEMPENHO PRODUTIVO

NYCOLAS LEVY PEREIRA

Orientadora: Dr^a Fabiana Pilarski

Co-orientador: Prof. Dr. Felix G. R. Reyes

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em aquicultura como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

JABOTICABAL - SÃO PAULO

2013

P436b Pereira, Nycolas Levy
βeta-glucano e mananligossacarídeo na alimentação de tilápias-
do-nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre as respostas hematológica,
imunológica e desempenho produtivo/ Nycolas Levy Pereira. --
Jaboticabal, 2013
x, 99 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura da UNESP, 2013

Orientadora: Dr^a Fabiana Pilarski

Co-orientador: Prof. Dr. Felix Guilherme Reyes Reyes

Banca examinadora: Prof. Dr Luiz Roberto Furlan, Marco Antônio
Andrade Belo

Bibliografia

1. Imunoestimulante. 2. Piscicultura. 3. Sanidade. 4. *S. agalactiae* I.
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da UNESP.

CDU 639.3.05

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por tudo que tenho e que sou.

Agradeço à professora Fabiana Pilarski pelo caminho trilhado ao meu lado até agora.

Agradeço especialmente à Karina, minha namorada, por ser meu porto seguro.

Dedico meu trabalho a todos os meus professores.

“Ter apenas esperteza e talento é a forma mais baixa de ser útil”

-Yamamoto Tsunemoto - Hagakure

ÍNDICE GERAL

Resumo.....	1
Abstract.....	2
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
a. Peixes e Ambiente de Criação.....	6
b. Oxitetraciclina.....	11
c. β-Glucanos.....	16
d. Mananoligossacarídeo.....	24
e. Referências.....	30
3. Experimento I: β-GLUCANO E OXITETRACICLINA NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIAS DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) CRIADAS EM TANQUES REDE SOBRE AS RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS, IMUNOLÓGICAS E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO.....	46
Resumo.....	47
Abstract.....	48
a. Introdução.....	49
b. Material e Métodos.....	50
c. Resultados.....	56
d. Discussão.....	62
e. Conclusões.....	68
f. Referências.....	68
g. Agradecimentos.....	68
4. Experimento II: COMPARAÇÃO DA INCLUSÃO DE B-GLUCANO E MANANOLIGOSSACARÍDEO NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIAS DO NILO COM A UTILIZAÇÃO DE OXITETRACICLINA.....	74
Resumo.....	75

Abstract.....	76
a. Introdução.....	77
b. Material e Métodos.....	68
c. Resultados.....	82
d. Discussão.....	86
e. Conclusões.....	90
f. Referências.....	90
g. Agradecimentos.....	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Relação entre métodos e concentração de aplicação de β-glucano com diferentes patógenos em infecção natural ou experimental. I.C.: intra-celomática. N.s.: tratamento não significativo. *Peixes imunossuprimidos com Aflatoxina B1.....	23
Tabela 2: Relação entre a concentração de mananoligossacarídeo na dieta e seus efeitos sobre, principalmente, o sistema imune dos peixes.....	29
Tabela 3: Níveis de garantia da formulação comercial utilizada no experimento...45	
Tabela 4. Composição química do MacroGard® segundo o fabricante.....	52
Tabela 5: Variáveis hematológicas de série vermelha. Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina; RBC: contagem de células vermelhas; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. Não houve diferença em relação aos tratamentos. Letras diferentes nas linhas significam diferença estatística entre os dias de coleta (Tukey).....	61
Tabela 6: Bioquímica sanguínea e cortisol sérico. PPT: proteína total plasmática. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças significativas (Tukey). *Valores não obtidos.....	61
Tabela 7: Burst: atividade respiratória de leucócitos. D.O.: Densidade óptica a 540nm. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças significativas (Tukey).....	62
Tabela 8: Níveis de Garantia (quantidade por kg de ração).....	78
Tabela 9: Composição química do MacroGard® segundo o fabricante.....	78
Tabela 10: Composição química do ActiveMos® segundo o fabricante.....	79
Tabela 11: Variáveis de imunidade inata. Burst: "Burst" respiratório de leucócitos.....	82
Tabela 12: Variáveis hematológicas de série vermelha. HB: Hemoglobina; Ht: Hematócrito; RBC: Quantidade de células vermelhas; VCM: Volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.....	83
Tabela 13 Parâmetros hematológicos de série branca. Tromb: Trombócitos; Leuc: Leucócitos; Mon: Monócitos; Linf: Linfócitos; Neut: Neutrófilos, Baso: Basófilos; Eos: Eosinófilos; L.I.:Linfócitos Imaturos.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Eixo Hipotálamo – Hipófise – Interrenal em peixes, adaptado de Mazeaud et al. (1977).....	9
Figura 2: Estrutura molecular da oxitetraciclina (à esquerda) (Coyne et al., 2004). À direita, sítio de ligação das tetraciclinas e do rRNA (Pioletti et al, 2001). Tet 1: tetraciclina; H34: sítio de ligação das tetraciclinas no DNA bacteriano; A-tRNA: tRNA promotor do complexo de iniciação de transcrição (Pioletti, 2001).....	11
Figura 3: Estrutura esquemática de um polímero de β-glucano (Tsoni & Brown, 2008).....	16
Figura 4: As células que expressam Dectina-1 (em camundongos) estão posicionadas nas portas de entradas de patógenos e locais de desenvolvimento de linfócitos T. A dectina -1 é expressa nas camadas dermais da pele e do palato (pontas de flechas) mas não nas células de Langherhans.A Dectin-1 também é expressa nas células apresentadoras de antígenos dos pulmões e do intestino (vilos e placas de Peyer), e células Dectina-1+ são encontradas em todas as áreas da pousa branca esplênica, incluindo centros germinativos (pequena ponta de flecha no linfonodo) e regiões de células T em volta da arteríola central (pequena ponta de flecha). O tecido linfóide organizado nasal (O-NALT) demonstra similaridades regionais aos dos linfonodos. No timo, células Dectina-1+ parecem se concentrar nas regiões de junção corticomedulares. E: epiderme; D: derme; PP: placa de Peyer; B: área de células B; T: área de células T; GC: centro germinativo; C: Cortex; M: medula (Reid et al., 2009).....	17
Figura 5: Molécula de α-manose.....	24
Figura 6: Ganho de peso médio (GPM). P = 0,0207.....	57
Figura 7: Taxa de Crescimento específico (TCE). P = 0,0207.....	57
Figura 8: Consumo total de alimento (Cons.). P = 0,0361.....	58
Figura 9: Conversão alimentar (CA). P = 0,0004.....	59
Figura 10: Mortalidade relativa aparente. P = 0,0045.....	59
Figura 11: Mortalidade dos peixes inoculados com 0,5mL de Solução contendo <i>Streptococcus agalactiae</i> a 10^6 UFC . mL⁻¹.....	85
Figura 12: Mortalidade dos peixes inoculados com solução de PBS.....	86

Resumo

O estresse ainda é um desafio na aquicultura mundial, não apenas pela diminuição da produtividade, mas, principalmente, por possibilitar o aparecimento de enfermidades devido a seus efeitos nocivos sobre o sistema imune, tanto inato quanto adaptativo. Na tentativa de evitar este problema, os aquicultores lançam mão de massivas quantidades de antimicrobianos, como medida terapêutica ou em doses diferentes das recomendadas, intentando a profilaxia de bacterioses oportunistas. O aparecimento de cepas bacterianas resistentes a uma ou mais drogas, incluindo à oxitetraciclina, já se tornou a maior ameaça à saúde pública da atualidade, e a Organização Mundial de Saúde, já a algum tempo, tenta regulamentar o uso não terapêutico destas substâncias. Tentando avaliar a possibilidade de substituição de agentes antimicrobianos na alimentação de peixes por substâncias mais seguras, os presentes experimentos tiveram como objetivo comparar os efeitos da inclusão de β -glucano e mananoligossacarídeo (MOS) com a inclusão de oxitetraciclina (Oxi) na alimentação de juvenis de tilápias do Nilo. No primeiro experimento, comparando a inclusão de Oxi com a de β -glucano para tilápias em tanques rede, o último mostrou resultados de sobrevivência iguais ao do antimicrobiano, além de melhor ganho de peso. Já no segundo experimento, comparando a inclusão de β -glucano, MOS e Oxi, os derivados de levedura não se mostraram diferentes do grupo controle, nem em relação às análises imunológicas, nem em relação às taxas de sobrevivência.

Abstract

The stress is a challenge in the world aquaculture, not only by the productivity decrease, but, mainly, by promoting the diseases outbreaks, due to its bad effects on the immune system, either innate or adaptative. Attempting to avoid these problems, the farmers use massive antibiotic quantities, as treatment or in different levels, aiming the prophylaxis to opportunists diseases. The emergence of bacterial strains resistant to drugs, including to oxytetracycline, had become the greatest menace to public health, and the World Health Organization, at already sometime, tries to regulate the non-therapeutic uses of these substances. Attempting to evaluate the possibility of the antibiotic substitution by safer substances, the present assays compared the effects of β -glucan and mannan oligosaccharide inclusion (MOS) with the oxytetracycline (Oxi) inclusion in juvenile Nile tilapia diets. In the first assay, comparing the inclusion of Oxi with the β -glucan in the diets of Nile tilapia reared in net cages, the immunestimulant showed survival results similar with the antibiotic, moreover better weight gain. In the second assay, comparing the inclusion of Oxi, β -glucan and MOS, the yeast derived showed no differences from the control group in relation with the immune analysis and survival rates.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O estresse ainda é um desafio na aquicultura mundial, principalmente pela diminuição da produtividade causada, entre outros fatores, pelo aparecimento de enfermidades e seus efeitos nocivos sobre o sistema imune, tanto inato quanto adaptativo (Wendelaar Bonga, 1997). Na tentativa de evitar este problema, os aquicultores lançam mão de massivas quantidades de antimicrobianos, como medida terapêutica, ou em doses diferentes das recomendadas, buscando a profilaxia de bacterioses oportunistas. Porém, os resultados não são promissores, pois peixes com o sistema imune suprimido e/ou estressados comem quantidades de alimento bem menores que a recomendável, diminuindo a eficiência de tais drogas e aumentando demasiadamente os custos de produção.

Tão ruim quanto a queda na lucratividade é o fluxo de antimicrobianos e seus metabólitos no ambiente, seja via excreção ou por contato direto com o alimento e com a água. O aparecimento de cepas bacterianas resistentes a uma ou mais drogas, incluindo à oxitetraciclina já se tornou uma grave ameaça à saúde pública (Levy & Marshal, 2004), e a Organização Mundial de Saúde, já há algum tempo, tenta extinguir o uso não terapêutico destas substâncias (WHO, 2001).

A oxitetraciclina, pertencente ao grupo das tetraciclinas, é um agente antimicrobiano de terceira geração (amplo espectro de ação), amplamente utilizado em diversas criações animais, inclusive na piscicultura, para o tratamento de enfermidades causadas por bactérias gram positivas, gram negativas e outros microrganismos como *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Rickettsia*. São antibióticos bacteriostáticos cujo mecanismo de ação consiste na inibição da síntese das proteínas bacterianas por fixar-se na subunidade ribossômica 30 S (Mediavilla et al., 2008).

Não existem dados publicados sobre as dosagens empregadas na inclusão dietária desta droga na aquicultura brasileira ou em outros países em desenvolvimento, porém sabemos que a utilização do antimicrobiano ocorre de forma indiscriminada e é amplamente utilizada na piscicultura brasileira, mesmo em espécies não recomendadas pelos fabricantes (vide bula de Tm700®, Phibro). Mesmo não havendo dados publicados, sabemos que a dosagem em que este medicamento é introduzido nas dietas comerciais são bem maiores que as recomendadas por Noga (2010), de 55 a 100 mg.kg⁻¹ de peso vivo e pelo Comitê Veterinário Europeu para Produtos Medicinais (CVMP), que é de 10 em 0,003 mg.kg⁻¹ (EMEA, 1995).

A alimentação de peixes com rações acrescidas de β-glucano ou mananoligossacarídeo, substâncias capazes de aumentar a resistência frente à patógenos e a situações estressantes, vem se tornando uma alternativa promissora frente ao uso de agentes antimicrobianos. O β-glucano, de modo geral, tem como via de ação a modulação da resposta imune inata (Sahoo e Mukherjee, 2001; Couso et al., 2003; Whittington et al., 2005; Misra et al., 2006a; Gopalakanan e Arul, 2009; Ai et al. 2007; Khuntu et al, 2009; Li et al., 2009). Já o MOS, além de ser capaz de influenciar este tipo de resposta imune (He et al., 2003; Staykov, 2007; Torrecillas et al., 2007; Rodriguez-Estrada et al., 2008; Samrongpan et al., 2008; Andrews et al., 2009), tem a capacidade de modular a microbiota intestinal, com o favorecimento de bactérias benéficas, como o *Lactobacillus* e o *Bifidubacterium* (Dimitroglou et al., 2009; Torrecillas et al., 2011). Vários estudos vêm demonstrando a eficiência deste tipo de aditivo alimentar, porém, os resultados variam muito de acordo com a espécie, clima e ambiente de criação.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo comparar a inclusão dietética do β-glucano e do mananoligossacarídeo (MOS) com uma ração medicada (oxitetraciclina) sobre as respostas hematológica e imunológica, bem como sobre o

desempenho produtivo de tilápia-do-nilo criada em tanque-rede e em condições de laboratório.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

a. *Peixes e o ambiente de criação*

Talvez um dos maiores passos dados pela humanidade ocorreu a cerca de dez mil anos atrás, com o desenvolvimento da agricultura. Ainda que mais recente, a piscicultura, provavelmente, surgiu com o seguimento da mesma ideia: driblar a necessidade de deslocar-se por grandes distâncias e as dificuldades (competição intra e interespecífica, etc.) para conseguir alimento. Apesar de desnecessário falar sobre os avanços que remontam a atividade de criar peixes desde seu início, à quase tanto tempo quanto a agricultura, pode-se, porém, observar que as dificuldades foram e continuam sendo as mesmas: aumentar a produção e a produtividade sem aumentar muito o esforço empregado na criação (nos dias atuais pode-se entender esforço como investimentos, infraestrutura ou insumos).

Alguns peixes de águas continentais ocupam lugar de destaque na piscicultura mundial, como a carpa, o bagre do canal e a tilápias-do-nilo. Esta última, foco do presente trabalho, foi trazida ao Brasil na década de 70 pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DENOCS), e hoje é a espécie que apresenta a maior parcela nos índices de peixes produzidos em território nacional.

Pertencente à família Cichlidae, o grupo das tilápias compreende diversas espécies, todas de origem africana. Segundo Popma & Lovshin (1995), as tilápias de importância comercial são divididas em três grupos, de acordo, basicamente, com seu comportamento reprodutivo: *Tilapia* spp., que incubam seus ovos em substratos; *Oreochromis* spp., as quais incubam os ovos na boca da fêmea; e *Sarotherodon* spp., que o fazem na boca dos machos ou de ambos.

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca por características zootécnicas interessantes, como crescimento rápido e fácil adaptação ao ambiente de criação (Galli & Torloni, 1986). Dentro de seu limite de resistência, suportam bem condições de baixa qualidade de água, baixas concentrações de oxigênio, grandes variações de pH, altos valores de salinidade e apresentam uma certa resistência a diversas enfermidades (Zaniboni Filho, 2004), o que a torna uma das espécies mais indicadas para a criação intensiva. Ainda, a espécie apresenta requisitos típicos preferidos pelo mercado consumidor, como carne branca de textura firme, sabor delicado, de fácil filetagem, ausência de espinhas em Y (Jory et al., 2000).

As tilápias possuem uma hierarquia baseada em confrontos entre os indivíduos, onde os maiores dominam os menores. O estresse social e físico do estabelecimento e manutenção desta hierarquia causa dano tanto ao dominante quanto ao submisso, sendo maior neste (FERNANDES, 1997), diminuindo a capacidade de adaptação, levando a uma imunossupressão e até mesmo a morte (BARTON & IWAMA, 1991).

Portanto, uma característica na criação da tilápia-do-nilo no Brasil, que não pode ser deixada de lado, é o fato desta ser realizada com exclusiva utilização de animais machos (geralmente revertidos pelo processo de alimentação das larvas com dieta contendo 17 α -metil-testosterona).

Binuramesh et al. (2006), trabalhando com *Oreochromis mossambicus* (Peters), compararam a secreção de cortisol e características imunológicas (inatas e adaptativas) em três grupos de peixes, um contendo apenas machos, um apenas fêmeas e o último contendo um número igual de machos e fêmeas. Os resultados encontrados foram valores mais altos de cortisol e prejuízos na defesa imunológica nos grupos monossexo em comparação ao terceiro grupo. Considerando o aumento de indivíduos por metro cúbico de água de criação, inerente à maioria dos processos que visam maior

produtividade (com isso maior disputa por comida e maior quantidade de excretas e matéria orgânica), somado aos manejos convencionais de uma piscicultura (transporte, biometria, formação de novos grupos de acordo com o peso, etc.), pode-se considerar a criação da tilápia monossexo em tanques-rede como potencialmente estressante.

Segundo Barton (1997), “estresse é a resposta celular ou orgânica para qualquer demanda imposta sobre um ser vivo, causando uma extensão de seu estado fisiológico para além do estado normal de repouso”. Vários pesquisadores propuseram outras definições para o termo, porém todas se referem à ideia de desconforto, dificuldade ou distúrbio.

O sistema nervoso central, ao detectar um agente estressante, aciona, como forma de alarme, neurônios que estimulam as células cromafins, presentes no rim cefálico, a produzir os hormônios catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Seguindo a ativação deste eixo, o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal é ativado, resultando na produção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pela hipófise e de

corticosteróides pelas células do tecido interrenal, numa cascata de estímulos. A secreção destes dois grupos de hormônios leva a alterações secundárias de ordem metabólica, iônica, hematológica e imunológica. A manutenção da exposição dos peixes a agentes estressores por tempo longo (exposição crônica) leva o organismo a uma fase de

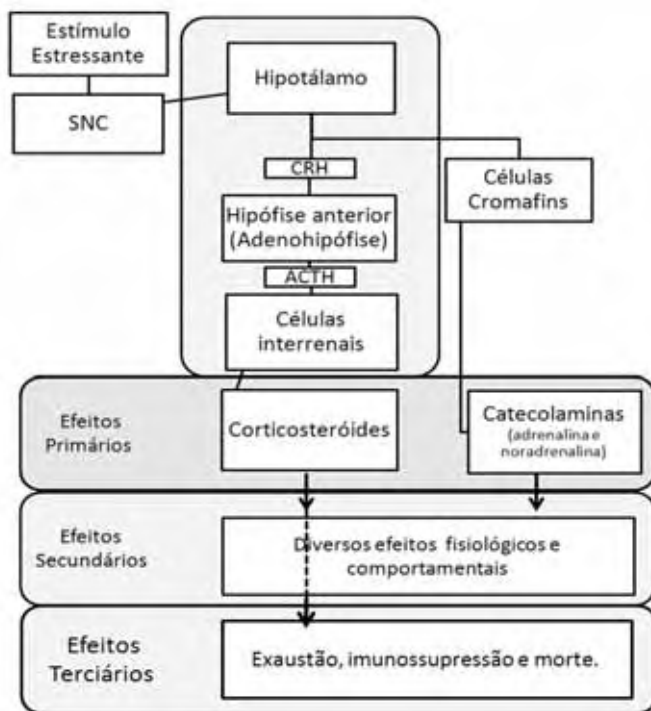


Figura 1: Eixo Hipotálamo – Hipófise – Interrenal em peixes, adaptado de Mazeaud et al. (1977).

exaustão e incapacidade adaptativa, com prejuízos no crescimento, reprodução e maior susceptibilidade a doenças (Figura 1) (Bonga, 1997).

O cortisol, por meio da circulação sanguínea, atinge importantes órgãos do sistema de defesa, como o fígado, baço e o rim, diminuindo a linfopoiese (Ellis, 1981). Agindo diretamente nos linfócitos, este hormônio alterou o número e a afinidade dos receptores específicos na membrana citoplasmática em *Cyprinus carpio* (Weyts et al., 1998), além de inibir a produção de interleucinas, substâncias que estimulam a proliferação de subpopulações de linfócitos T e recrutamento de linfócitos B, sendo estes últimos responsáveis pela produção de anticorpos, e pela possibilidade de se tornarem células de memória contra possíveis infecções futuras (Wedemeyer, 1996). Além disso, já foram encontrados valores de atividade de lisozima e produção de espécies reativas de nitrogênio inversamente proporcionais aos níveis de cortisol, assim como aumento da taxa de mortalidade após um desafio bacteriano (Binuramesh et al., 2006).

Por que é tão importante conhecer a ação do estresse em peixes? Sob o ponto de vista evolutivo, tanto os patógenos quanto seus respectivos hospedeiros evoluíram juntos durante centenas de milhões de anos (bem mais tempo no caso de certas espécies de peixes), surgindo assim um “equilíbrio” entre eles. A esta corrida evolutiva em que tanto parasito quanto hospedeiro evoluem apenas para manter o status de homeostase é dado o nome de "Hipótese da Rainha Vermelha" (Van Valen, 1973)*. Quando entra em situação de estresse, como já dito previamente, o equilíbrio então é quebrado, e os organismos que viviam, de certo modo, sem promoverem enfermidades em seus hospedeiros agora se deparam com as barreiras imunológicas reduzidas. Assim, surgem as enfermidades oportunistas, causadas por parasitos e bactérias que dizimam lotes de peixes aguda ou prolongadamente estressados, seja por transporte, classificação,

mudanças de temperatura e pluviosidade, má qualidade de água, mal estado nutricional dentre outras (Lively et al., 1990).

*Nas décadas de 60 e 70, Leigh Van Valen, tentando explicar alguns fenômenos evolutivos, criou o termo "Hipótese da Rainha Vermelha", fazendo alusão ao livro de Lewis Carroll, "Alice no País das Maravilhas". No conto, as personagens Alice e a Rainha Vermelha disputam uma corrida, mas ambas não saem do lugar. Com a mesma idéia, a comunidade científica adotou a hipótese para explicar a teoria da co-evolução de hospedeiros e parasitos, onde, mesmo apresentando diferenças genóticas entre pais e descendentes, não havia eliminação do organismo competidor. Uma corrida que ambos os competidores não saem do lugar.

b. Oxitetraciclina

A utilização de antimicrobianos na alimentação animal vem causando grande preocupação nas comunidades internacionais, principalmente no mercado europeu. O aparecimento de cepas bacterianas resistentes a um ou mais princípios ativos são uma ameaça não apenas aos animais de criação, mas também à saúde humana.

A oxitetraciclina, antimicrobiano com amplo espectro de ação, é utilizada no tratamento de anthrax, clamídia, cólera, malária, sífilis, tifo, infecções respiratórias e causadas por *Streptococcus*, entre outros (Dollery, 1999). Assim como outros compostos do grupo das tetraciclina, ela age inibindo a síntese de proteínas bacterianas interferindo na ligação do tRNA aminoacetilado ao sítio A da subunidade 30S dos ribossomos bacterianos (Figura 2), consequentemente impedindo o aparecimento do complexo de iniciação de tradução (Spahn e Prescott, 1996).

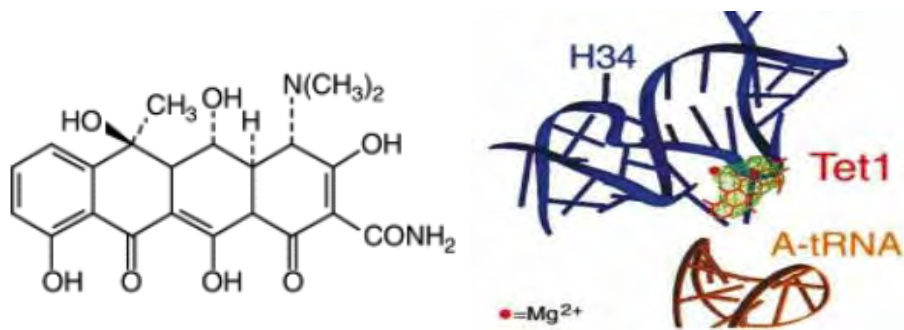


Figura 2: Estrutura molecular da oxitetraciclina (à esquerda) (Coyne et al., 2004). À direita, sítio de ligação das tetraciclina e do rRNA (Pioletti et al., 2001). Tet 1: tetraciclina; H34: sítio de ligação das tetraciclina no DNA bacteriano; A-tRNA: tRNA promotor do complexo de iniciação de tradução (Pioletti, 2001).

Na aquicultura brasileira a oxitetraciclina é amplamente utilizada na criação de várias espécies, muitas sem recomendações dos fabricantes, como ciclídeos e caracídeos, e não apenas no tratamento de enfermidades, mas também no período pré-

manejo, visando evitar surtos de enfermidades infecciosas. De acordo com a bula de um dos fornecedores do medicamento no Brasil (Tm700, Phibro), ele é indicado para o tratamento da septicemia hemorrágica (*Aeromonas liquefaciens*), doenças causadas por *Pseudomonas* sp., doença ulcerosa (*Haemophilus piscium*) e furunculose (*Aeromonas salmonicida*) em bagres e salmonídeos, na concentração de 8,3 g.kg⁻¹ de peso vivo de oxitetraciclina ou 11,85 g.kg⁻¹ de peso vivo por dia do produto comercial, com um período de carência de 21 dias.

Contrastando esta informação, Noga (2010) preconiza o uso da oxitetraciclina (produto contendo 20% do princípio ativo) em uma dose mais baixa, variando de 55 a 100 mg.kg⁻¹ de peso vivo (11 a 20 mg.kg⁻¹ de peso vivo), aproximadamente 400 a 700 vezes mais baixa que a indicada na bula do produto citado anteriormente.

Como existem poucas informações no Brasil sobre como esses fármacos devem ser utilizados em peixes, qual a concentração e a forma ideal de administração, estas são utilizadas de forma indiscriminada, ocasionando sérios impactos na saúde animal, humana e ambiental.

Os medicamentos utilizados em animais destinados ao consumo humano precisam seguir regulamentações, nas quais é determinada a quantidade máxima de resíduos que podem remanescer nos alimentos (LMR) e não induz efeito adverso à saúde humana. Para tanto, deve-se considerar a ingestão diária aceitável (IDA) do composto (quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem que provoque danos à saúde), expressa em mg/kg de massa corpórea e baseia-se em informações toxicológicas disponíveis do composto na época da avaliação (JECFA, 2007).

Para que essas quantidades máximas não sejam ultrapassadas, faz-se necessário o cumprimento às boas práticas veterinárias, respeitando o período de carência de cada

medicamento, pois estes valores já são determinados com base no tempo de absorção, metabolização e excreção dos fármacos dos tecidos (Castello-Branco, 2012).

A Comunidade Europeia, através do Comitê para produtos medicinais de uso veterinário (CVMP), da Agência de Avaliação Medicinal Europeia (EMA, 2008) estabeleceu o LMR para a oxitetraciclina em pescado de 100 µg/kg. Este valor refere-se à análise em músculo e pele em proporções naturais (soma do medicamento base e seu 4-epímero) (EU n° 37/2010).

A presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos é um tema de elevada importância para a saúde dos consumidores, uma vez que a ingestão de doses diárias destes e sem prévio conhecimento, pode levar a seleção de formas resistentes de bactérias no organismo, bem como problemas alérgicos e efeitos tóxicos (Vásquez et al., 2001).

É de conhecimento geral que a inserção de antimicrobianos em subdosagens na dieta de animais de criação, pode apresentar efeitos benéficos nos parâmetros produtivos, inclusive em peixes (Choubert et al., 1991a; Cravedi et al., 1987; Choubert et al., 1991a, b; Viola & Arieli 1987; Zoccarato et al., 1995). Rijkers et al. (1980), em trabalho realizado com carpa comum (*Cyprino carpio*) alimentadas com uma dieta contendo 2000 ppm de oxitetraciclina, relataram um aumento do ganho de peso destas após um mês de consumo da dieta (o inverso foi registrado nos grupos em que o antimicrobiano foi fornecido por meio de injeção intracelomática).

Os efeitos dos antimicrobianos sobre o sistema imune dos peixes parecem depender das características intrínsecas da droga, da quantidade administrada e do animal utilizado como modelo experimental, porém a oxitetraciclina tem se mostrado um possível agente de imunossupressão. Rijkers et al., (1980) encontraram um número reduzido de linfócitos somados a monócitos e de eritrócitos em carpas inoculadas

intracelomaticamente com oxitetraciclina quando comparadas com peixes não inoculados (controle). O mesmo efeito não foi observado nos peixes alimentados com o medicamento. Em trabalho semelhante, realizado pelos mesmos pesquisadores (Rijkers et al., 1981), utilizando as mesmas vias de administração do antimicrobiano, observaram uma grande diminuição de imunoglobulinas em carpas alimentadas com a dieta medicada. Ainda, foi observada diminuição na resposta primária anti-RBC no rim e baço de coelho em relação ao grupo controle. Esta inibição na resposta imune inata e adaptativa, segundo os autores, se deve à redução da carga bacteriana e, conseqüentemente, antigênica presente no organismo dos peixes, levando a uma queda da atividade imunológica. Duas possibilidades citadas pelos autores são a inibição da clivagem das moléculas de C3 em compostos ativos, iniciando via lítica e a fagocitose (Alexander, 1975), e a segunda, a inibição da diferenciação de células T, conseqüentemente impedindo a diferenciação das células B em plasmócitos, na resposta de antígenos T dependentes (Rijkers et al., 1980).

Siwiki et al. (1989), testaram uma injeção contendo oxitetraciclina e antígeno de *Yersinia ruckeri* em truta arco-íris, *Onchorinchus mykiss*, e observaram uma redução na quantidade de células produtoras de anticorpos nos peixes inoculados com o antimicrobiano e antígeno em relação aos peixes do grupo controle. Yonar et al. (2011), observaram uma diminuição na quantidade de anticorpos e na atividade respiratória de leucócitos em peixes inoculados com o medicamento.

A oxitetraciclina é um forte promotor de degradação lipídica, gerando espécies reativas de oxigênio e hidrogênio, como o peroxinitrito e radicais hidroxila, levando à degradação de membranas celulares e, conseqüentemente, a efeitos nocivos como degradação muscular e nervosa, deteriorações metabólicas e morte celular (Frankell, 1995; Kelly et al., 1998). Yonar et. al (2011), alimentando trutas arco-íris com uma

dieta contendo 100 mg.kg^{-1} da droga, encontraram níveis reduzidos de algumas enzimas responsáveis pela proteção tecidual contra agentes oxidantes, sugerindo uma exaustão na capacidade antioxidante pelo organismos destes peixes.

Toften & Jobling (1997) demonstraram que a oxitetraciclina, assim como outros medicamentos, reduz a palatabilidade do alimento, diminuindo sua ingestão. No mesmo experimento, utilizando a inclusão de 20 mg.Kg^{-1} do antimicrobiano na dieta, os autores encontraram uma diminuição do coeficiente de digestibilidade de matéria seca e na taxa de crescimento específico em salmão do atlântico, *Salmo salar*.

c. β -Glucanos

A classe dos glucanos abrange todos os polímeros de glicose, inclusive a celulose (β -1,4-glucano), apresentando inúmeras variações entre cada um deles, como tamanho da cadeia principal, peso molecular, presença ou ausência de ramificações, isômeros α ou β , e solúveis ou particulados (Figura 3). De acordo com Goodridge et al. (2009), os estudos sobre os efeitos imunomodulatórios, em sua maioria, dizem respeito ao β -1,3/1,6-glucano, extraído da parede celular de fungos, como leveduras e cogumelos, e de algumas espécies de bactérias e algas.

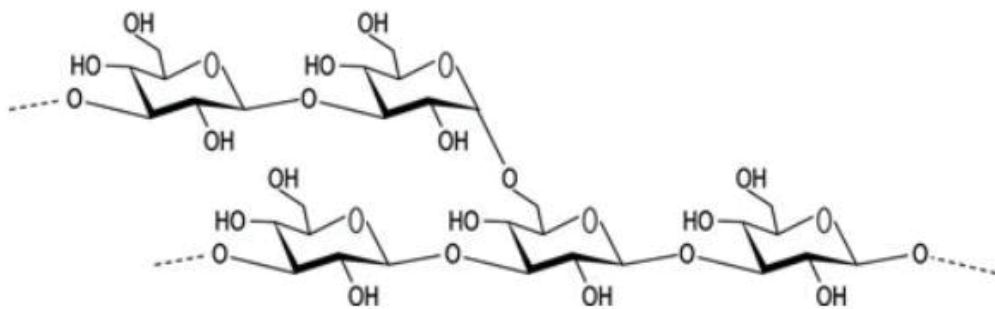


Figura 3: Estrutura esquemática de um polímero de β -glucano (Tsoni & Brown, 2008).

A razão, pela qual o β -glucano consegue desempenhar um efeito imunostimulatório em peixes ainda não está totalmente elucidada, porém, em estudos realizados com salmão do atlântico, Engstad & Robertsen (1993) observaram que os macrófagos destes peixes possuem receptores específicos para o reconhecimento deste composto.

Evolutivamente, os organismos pluricelulares aprenderam a reconhecer certas estruturas conservadas, presentes em organismos possivelmente patogênicos (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) através de receptores presentes na superfície celular do hospedeiro, os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs)

(Medzhitov, 2007), identificados como receptores de lectina tipo C (CLRs), dependentes de cálcio, e os receptores toll-like (TLRs). Dentre os CLRs estão os receptores de dectina-1 (Figura 4), uma proteína transmembrana com uma cauda intracelular contendo um imunoreceptor (imunoreceptor tyrosine-based activation-like motif ou ITAM-like). A expressão deste receptor pode sofrer influência de diversos fatores como a presença de citocinas e componentes microbianos. Altos níveis de expressão da dectina-1 podem ser encontrados em superfícies mucosas, como a do trato intestinal, sujeita a uma enorme gama de microrganismos, sugerindo que há certa preparação destes epitélios contra possíveis ameaças externas, além de macrófagos e neutrófilos (principalmente estas duas células) e outras células do sistema imune (Vautier et al., 2011).

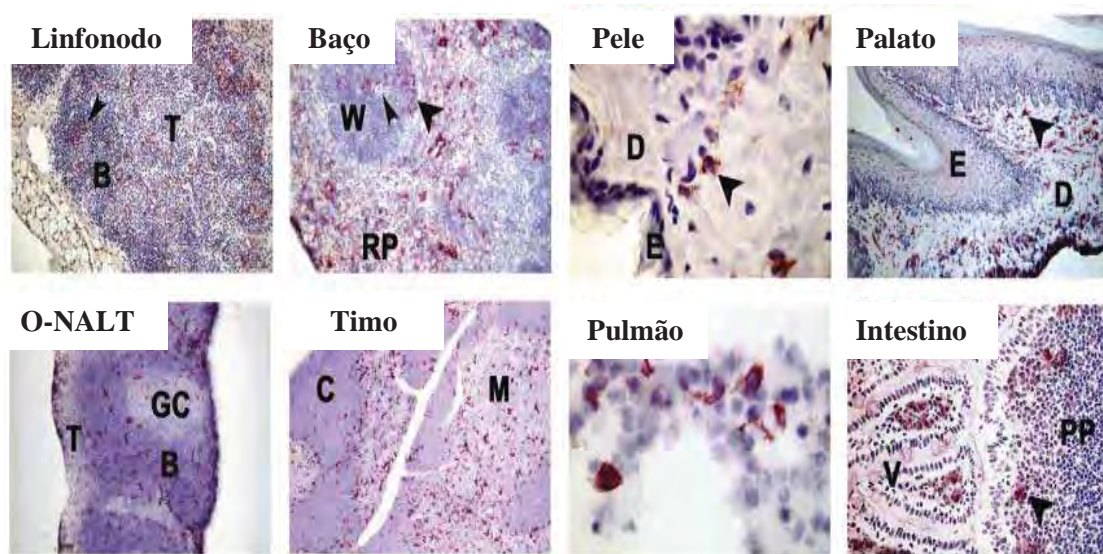


Figura 4: As células que expressam Dectina-1 (em camundongos) estão posicionadas nas portas de entradas de patógenos e locais de desenvolvimento de linfócitos T. A dectina -1 é expressa nas camadas dermais da pele e do palato (pontas de flechas) mas não nas células de Langherhans. A Dectin-1 também é expressa nas células apresentadoras de antígenos dos pulmões e do intestino (vilos e placas de Peyer), e células Dectina-1+ são encontradas em todas as áreas da poupa branca esplênica, incluindo centros germinativos (pequena ponta de flecha no linfonodo) e regiões de células T em volta da arteríola central (pequena ponta de flecha). O tecido linfóide organizado nasal (O-NALT) demonstra similaridades regionais aos dos linfonodos. No timo, células Dectina-1+ parecem se concentrar nas regiões de junção corticomedulares. E: epiderme; D: derme; PP: placa de Peyer; B: área de células B; T: área de células T; GC: centro germinativo; C: Cortex; M: medula (Reid et al., 2009).

Até o momento não foram encontrados estudos relatando a presença e/ou função deste receptor em peixes, porém em mamíferos, a ligação do β -glucano à Dectina-1 pode desencadear uma série de efeitos, como a maturação de células dendríticas, endocitose do ligante, aumento da atividade respiratória de leucócitos, produção de metabólitos do ácido aracdônico e de citocinas e quimiocinas, como TNF (fator de necrose tumoral), CXCL-2 (proteína de macrófagos inflamatória-2- α), IL-23 (Interleucina-23), IL-6 e IL-10 (Brown et al, 2006). Todavia, essas funções podem variar, dependendo da célula em que este receptor é expresso de acordo com a co-estimulação de outros receptores (Reid et al., 2009).

Brown et al. (2002), utilizaram uma solução contendo laminarin purificado (β -1,3-glucano) e observaram que a presença deste polissacarídeo inibiu o reconhecimento de grânulos de zymozan por macrófagos de camundongos, demonstrando a alta dependência dos receptores ligantes ao β -glucano neste processo. Ainda neste trabalho, utilizando anticorpos monoclonais anti-Dectina-1, observaram que a opsonização deste receptor diminuiu o reconhecimento dos grânulos de zymozan quase ao mesmo nível da adição do β -glucano exógeno, concluindo que a Dectina-1 é o receptor mais importante no reconhecimento de grânulos de zymozan por macrófagos.

Outros receptores considerados secundários no reconhecimento do β -glucano pelo organismo de mamíferos são a proteína surfactante D (SP-D) e a lactosilceramida. A SP-D é geralmente encontrada nos pulmões destes animais (Holmskov et al., 2003), e sua função está mais relacionada com a aglutinação de microrganismos sem ativação das proteínas do complemento, agindo em um amplo espectro de antígenos fúngicos (Kishore et al., 2006). Além de ativar uma série de mecanismos de imunidade celular de forma ainda não elucidada, como a fagocitose, produção de interleucinas e atividade respiratória de leucócitos (Kishore et al., 2006), a SP-D também inibe a ingestão de

Candida e *Pneumocystis* e promove a captura e eliminação de *Aspergillus* (Crouch & Wright, 2001). A lactosilceramida, produzida pelo aparato de Golgi, ao interagir com o β -glucano, promove o aumento da atividade respiratória e ativação de neutrófilos por NF- κ B (Fator Nuclear κ B) (Wakshull et al., 1999).

Apesar da lacuna no conhecimento dos mecanismos de ação do β -glucano sobre o sistema imunológico dos peixes, vários estudos tem demonstrado a eficiência do uso deste polímero de glicose na aquicultura.

Com relação ao desempenho produtivo, Ai et al. (2007) observaram aumento na taxa de crescimento específico com a inserção de 0,09% β -glucano na dieta de *Pseudosciaena crocea*, porém, com o aumento da concentração do produto para 0,18%, esta taxa retornou ao patamar da dieta controle. Cain et al. (2003) observaram em tilápia-do-nilo alimentada com dieta acrescida de β -glucano derivado de bactérias, que após 21 dias de alimentação houve diminuição dos níveis de cortisol sérico e da glicose com valores semelhantes aos do grupo controle. Interessantemente, Cook et al. (2003) verificaram um aumento do peso médio de *Pagrus auratus* alimentados com dieta contendo 0,1% de β -glucano, com temperatura da água de 12 °C, quando comparado com o grupo controle, porém essa diferença não foi observada quando as mesmas dietas foram fornecidas aos peixes mantidos à temperatura de 24 °C. De acordo com os autores, a temperatura baixa suprime o sistema imune dos peixes, e, neste caso a inclusão de β -glucano na dieta mostrou ser uma boa estratégia durante os períodos mais frios do ano. Em contraste, Whittington et al. (2005) e Li et al. (2009), apesar de observarem melhoras no sistema imunológico de peixes alimentados com rações contendo β -glucano, o mesmo não foi constatado para o desempenho produtivo dos animais.

Modulações no sistema imune inato também têm sido demonstradas. Ai et al. (2007) observaram um aumento na produção de lisozima sérica conjuntamente ao aumento da quantidade de glucano na dieta, porém o mesmo não ocorreu com a atividade de complemento (via alternativa), onde não foram encontradas diferenças entre os grupos alimentados com dietas contendo glucano e o grupo controle. De modo semelhante, Li et al. (2009) encontraram efeito dose resposta para a atividade respiratória de leucócitos em peixes alimentados com dietas contendo diferentes níveis de β -glucano, onde a maior dose (0.2%) produziu resultados próximos a do grupo alimentado com a dieta controle, diferindo do grupo alimentado com 0,05 e 0,1%, salientando que a ação deste imunostimulante depende da quantidade de imunostimulante inserida na dieta, já que o excesso de β -glucano compete pelos ligantes, impedindo que o reconhecimento e a fagocitose dos microrganismos patogênicos sejam realizados (Müller et al., 1996 em Castro et al., 1999).

Castro et al. (1999), testaram diferentes tipos de β -glucanos (diferentes marcas) e observaram que, de acordo com a estrutura do polímero, há diferença não apenas no aumento da atividade respiratória de leucócitos, como também na velocidade com que os macrófagos conseguiram responder ao estímulo, onde as estruturas maiores e mais ramificadas tem dificuldade para ativar os macrófagos, pois os receptores não conseguem alcançar os sítios de ligação.

Sahoo & Mukherjee (2001), utilizando peixes imunossuprimidos experimentalmente por injeção de Aflatoxina B1, encontraram, nos peixes alimentados com dieta inclusa com glucano, índices fagocíticos duas vezes maiores do que nos peixes do grupo controle (não imunossuprimidos e não alimentados com β -glucano) e taxa fagocítica oito vezes superior. Bagnia et al. (2005) encontraram aumento significativo na atividade da via alternativa do complemento e na quantidade de

lisozima sérica em robalo português, *Dicentrarchus labrax* alimentados com 0,1% de β -glucano, porém, esse aumento não foi observado no mesmo dia da amostragem, sendo o pico da atividade do complemento encontrado após 15 dias de alimentação, e o da quantidade de lisozima, 30 dias após. Ainda neste trabalho, os autores, testando os efeitos da alimentação com este imunostimulante por períodos longos (ciclos de 15 dias de dieta experimental e 30 de controle), não encontraram diferenças entre a atividade da via alternativa do complemento e da quantidade de lisozima, com o passar do tempo, entre o grupo tratado e controle. Essas diferenças foram observadas após o término do segundo ciclo, mas não ao final do terceiro e quarto ciclo, o que corrobora com o proposto por Castro et al. (1999), onde doses muito elevadas de β -glucano podem exaurir as reservas energéticas dos macrófagos, desencadeando uma exaustão do sistema imunológico. Gopalakannan & Arul (2009), utilizando carpas comum alimentadas com o imunostimulante, observaram aumento da lisozima 15 dias após a alimentação e o dobro do valor encontrado 30 dias após a alimentação com o imunostimulante. A atividade respiratória dos leucócitos apresentou o seu maior valor juntamente com os maiores valores da lisozima.

Paulsen et al. (2003) demonstraram que a intensidade com que o β -glucano promove a expressão dos genes codificadores da lisozima em diferentes órgãos é diferente, e que a produção desta difere da mesma forma, já que este imunostimulante parece aumentar a quantidade de lisozima no rim cranial e no intestino, mas não no baço e no fígado. Ainda com relação à lisozima, Bonaldo et al. (2006) não encontraram efeitos da inclusão de β -glucano na dieta de *Dicentrarchus labrax*, mesmo utilizando doses próximas dos experimentos citados anteriormente. Cook et al. (2001), demonstraram aumento da atividade respiratória dos leucócitos de pink snapper (*Pagrus auratus*) pelo ensaio de NBT e *in vitro* a ativação dos macrófagos por meio da

incubação destes após o isolamento do rim cefálico em uma solução contendo diferentes doses de β -glucano. Além da estimulação da resposta imune inata, foram observadas melhorias em alguns parâmetros da resposta imune adaptativa. Aakre et al. (1994), utilizando β -glucano como adjuvante na vacinação de salmão do atlântico contra *Aeromonas salmonicida*, relataram aumento na titulação de anticorpos dos peixes vacinados com o adjuvante quando comparados com peixes vacinados sem o adjuvante.

Foram observados muitos trabalhos demonstrando os efeitos benéficos do uso do β -glucano na dieta de peixes desafiados experimentalmente com patógenos (Tabela 1). Porém, foram observados efeitos negativos ou a ausência de efeitos, como relatado Bridle et al. (2005), que não obtiveram maior sobrevivência de salmão do atlântico após os mesmos serem alimentados com três diferentes marcas comerciais de β -glucano após o desafio com (*Neoparamoeba* spp).

Tabela 1: Relação entre métodos e concentração de aplicação de β-glicano com diferentes patógenos em infecção natural ou experimental. I.C.: intra-celomática. N.s.: tratamento não significativo. *Peixes imunossuprimidos com Aflatoxina B1.

Peixe	Método de administração	Concentração	Patógeno	Efeito	Referência
<i>Chana striata</i>	I.P.	100µL (10mg.mL)	<i>Aphanomyces invadans</i>	Aumento da sobrevivência	Miles et al. (2001)
<i>Cyprinus carpio</i>	Inclusão na dieta	1%	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Maior sobrevivência que a do grupo controle e a do grupo alimentado com parede de levedura.	Gopalakannan & Arul (2009)
<i>Labeo rohita</i> (pós-larvas)	Inclusão na dieta	0,001; 0,025 e 0,05%	<i>A. hydrophila</i> e <i>Edwardsiella tarda</i>	Maior porcentagem de sobrevivência em 0,025%, seguido de 0,001 e 0,05%, todos maiores que a sobrevivência do controle	Misra et al. (2006a)
<i>Labeo rohita</i> (pós-larvas)	I.P. uma, duas e três doses	0,2; 0,4 e 0,6mg.mL-1	<i>A. hydrophila</i> e <i>E. tarda</i>	Maior Sobrevivência no grupo que recebeu duas doses	Misra et al. (2006b)
<i>Labeo rohita</i> *	Inclusão na dieta	0,10%	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aumento da sobrevivências mesmo com os peixes imunossuprimidos	Sahoo & Mukherjee (2001)
<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i>	Inclusão na dieta	0,05; 0,1 e 0,2%	<i>Streptococcus iniae</i>	Redução drástica da mortalidade em 0,1% de inclusão	Li et al. (2009)
<i>Onchorynchus mykiss</i>	I.P.	100µg (em 100µL)	<i>Loma Salmonae</i>	Diminuição drástica do número de xenomas nas brânquias	Guselle et al. (2007)
<i>Onchorynchus mykiss</i>	Inclusão na dieta	0,2;0,6 e 1,8%	<i>Flavobacterium columnare</i>	Aumento da sobrevivência em 1,8%	Kunttu et al. (2009)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Inclusão na dieta	0,05; 0,1 e 0,2%	<i>Streptococcus iniae</i>	N.s.	Whittington et al. (2005)
<i>Pseudosciaena crocea</i>	Inclusão na dieta	0,09 e 0,18%	<i>Vibrio harveyi</i>	Aumento da produção de lisozima, burst respiratório e sobrevivência em 0,09%	Ai et al. (2007)
<i>Salmo salar</i>	Adjuvante de vacina	5mg . ml-1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Aumento da sobrevivência na primeira dose	Aakre et al. (1994)
<i>Scophthalmus maximus</i>	Inclusão na dieta	2%	<i>Vibrio anguillarum</i>	Sobrevivência do grupo tratado não difere do controle	Baulny et al (1996)
<i>Sparus auratus</i>	Inclusão na dieta	0,1 e 1% de três fabricantes diferentes	<i>Photobacterium damselae</i>	Dois das marcas diminuíram drasticamente a mortalidade nas concentrações de 1%	Couso et al. (2003)

d. Mananoglicosarídeo

O mananoglicosarídeo (MOS) é um complexo proteico rico em manose fosforilada, glucose e proteína, e, assim como o β -glucano, é extraído da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e frequentemente utilizado como aditivo alimentar para vários grupos de animais. Uma vez dentro do intestino, o MOS pode desempenhar as seguintes funções: modular resposta imunológica, alterar o perfil bacteriano da microbiota intestinal, aumentando o número de lactobacilos fecais (Swanson et al., 2002) e de bifidobactérias (Grieshop et al., 2004) e preservar a integridade da superfície de absorção intestinal, ao bloquear a aderência das bactérias patogênicas às células epiteliais da mucosa do intestino.

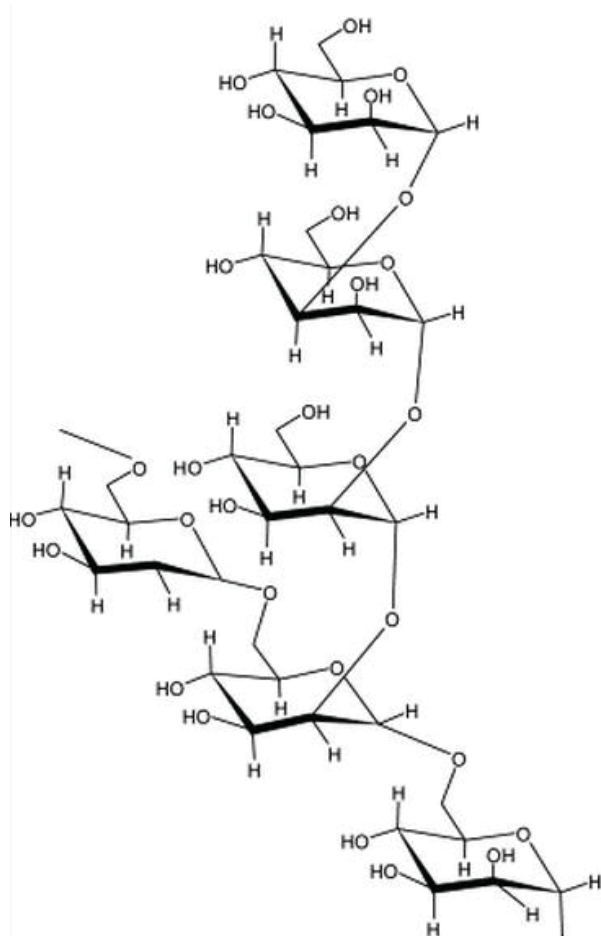


Figura 5: Estrutura esquemática de uma α -manose.

Estruturalmente, a manose é considerada um PAMP (padrão molecular associado a patógenos), podendo ser reconhecida por receptores específicos chamados PRRs (receptores de reconhecimento de patógenos), expressos em diversas células do sistema imune. Em mamíferos, alguns PRRs capazes de reconhecer a manana já foram descritos, como o Toll-like receptor 4 (TLR-4), colectinas, receptor de manose (MR), Dectina-2 e o ligante-I-CAM-3 não integrina específico de células dendríticas (DC-SIGN) (Willment & Brown, 2007).

O MR é um receptor transmembrana amplamente expresso em macrófagos teciduais e em células dendríticas, assim como no tecido hepático e no endotélio linfático (McKenzie et al., 2007; Taylor et al., 2005), desempenhando a maior parte de suas atividades intracelularmente. Alguns estudos mostram que o receptor de manose pode induzir a ativação do NF- κ B (nuclear factor κ B) e a produção de várias citocinas, como IL-12, IL-8, IL-1 β , IL-6 e fator de estimulação de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) (Taylor et al., 2005; Zhang et al., 2004; Pietrela et al., 2005).

A dectina-2 pode ser encontrada facilmente em macrófagos teciduais, mas também em células de Langerhans e em células dendríticas, e sua expressão sofre um aumento em casos de inflamações, incluindo as induzidas por fungos (Ariizumi et al., 2000; Taylor et al., 2005). Os mecanismos pelos quais a dectina-2 desempenha suas funções de reconhecimento de invasores ainda não estão bem elucidados, porém sabe-se que ela é capaz de aumentar a produção de antagonistas aos receptores de TNF e IL-1 (Sato et al., 2006).

O receptor DC-SIGN (CD 209), presente nas células dendríticas, já foi encontrado em linhagens de macrófagos e em endotélios (Koppel et al., 2005; Krutzki et al., 2005; Lai et al., 2006; Tailleux et al., 2005). Capaz de reconhecer estruturas ricas em manose de uma forma cálcio dependente, o DC-SIGN é capaz de promover a endocitose de antígenos, assim como a fagocitose em alguns casos (Cambi et al., 2003; Serrano-Gomes et al., 2004; Koppel et al., 2005). É proposto que, este receptor, através da modulação das respostas mediadas por TLRs, induza níveis elevados de IL-10, uma citocina com atividades imunossupressoras, sendo este fenômeno uma estratégia evolutiva de patógenos para conseguir invadir um organismo hospedeiro (Van Kooyk & Geitjenbeek, 2003). Dentre as colectinas, encontram-se as proteínas surfactantes A e D (SP-S e SP-D) e a lectina ligante à manose (MBL). A MBL é um receptor capaz de

ativar as proteínas do complemento, ocasionando a deposição destas (ou opsonização) sobre a superfície do microrganismo, assim como agir como uma opsonina por si própria (Holmskov et al., 2003; Kilpatrick, 2002). Há suspeitas de que a MBL possa modular respostas inflamatórias, porém poucos estudos tem sido realizados e o mecanismo por trás deste fenômeno ainda são desconhecidos (Chaka et al., 1997). As SP-A e D tem um amplo espectro de ligantes, tendo como funções principais a aglutinação de patógenos, assim como a fagocitose, produção de citocinas e aumento da atividade respiratória de leucócitos (Crouch & Wright, 2001).

Até o momento, o PRR específico para manose em peixes não foi identificado, e poucos estudos tem sido realizados visando à caracterização destes. Rodríguez et al. (2003), trabalharam com leucócitos isolados de robalo português, pré-incubados com cloroquina, uma substância inibitória de receptores de manose em mamíferos e encontraram índices fagocíticos reduzidos quando os fagócitos foram incubados com *Saccharomyces cerevisiae*.

Alimentando *Dicentrarchus labrax* com MOS, Torrecillas et al. (2007), observaram uma queda na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos animais que receberam 0,2% do prebiótico e um aumento desta produção no grupo alimentado com 0,4%. Andrews et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes com carpa indiana, *Labeo rohita* alimentada com 1, 2 e 4% de MOS. Staykov et al. (2007), alimentaram trutas arco-íris mantidas em tanques rede com 0,2% de MOS por 60 dias e encontraram aumento nos níveis séricos de lisozima, assim como no título de anticorpos e atividade do complemento. Resultados similares foram encontrados por Zhou & Li (2004) e Staykov et al. (2005). Zhou et al. (2010), observaram maior quantidade de lisozima em *Sciaenops ocellatus* alimentados com 1% de MOS, mas nenhuma diferença foi observada com relação à atividade respiratória de leucócitos.

O efeito prebiótico do mananoligossacarídeo adicionado à dieta de animais de criação, observado por vários pesquisadores pode ocorrer por uma série de fatores intrínsecos à estrutura deste composto. Oyofó et al. (1989a e b) e Spring et al. (2000) mostraram que as partículas de MOS são capazes de adsorver as bactérias gram-negativas com fímbrias tipo 1 em sua superfície, o que não apenas previne a aderência destas bactérias ao epitélio intestinal, mas também as remove (Yang et al., 2009). Zentek et al. (2002) e Vasques et al. (2005), constataram que o MOS, quando adicionado à dieta, pela especificidade de sua fermentação, estimula o crescimento e a estabilidade de populações microbianas produtoras de ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), os quais reduzem o pH luminal do intestino e, juntamente com enzimas produzidas por esta microbiota, inibem a proliferação de microrganismos patogênicos, como o *Vibrio* sp. dentre outros.

Torrecillas et al. (2011), alimentando *Dicentrarchus labrax* com 0,4% de MOS, observaram uma redução, após o isolamento bacteriano realizado no fígado, baço e rim cefálico de *Vibrio anguillarum* e *Aeromonas hydrophila* no epitélio intestinal dos peixes. Baurhoo et al. (2007) e Sims et al. (2004) encontraram aumento na quantidade de *Lactobacillus* no intestino de frangos e perus alimentados com ração adicionada de MOS.

As bactérias ácido lácticas, como as do grupo dos *Lactobacillus*, são conhecidas por serem capazes de modular resposta imune inata, localmente e sistemicamente (Cross, 2002). Alguns autores mostram melhorias no sistema imune inato devido à presença de algumas espécies de *Lactobacillus* na microbiota intestinal. Panigrahi et al. (2011) observaram mudanças benéficas no perfil de expressão de genes de interleucinas como TGF- β , TNF- α , IFN e alguns genes de imunoglobulinas, tanto no baço quanto no rim cefálico de trutas arco-íris após alimentá-las com *Lactobacillus rhamnosus*

liofilizados. Alimentando larvas de *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata* com rotíferos e artêmia enriquecidos com *L. fructivorans* e *L. plantarum*, Abelli et al. (2009) encontraram níveis menores de transcritos IL-1 β , IL-10, cox-2 e TGF- β . Porém, Harikrishnan et al. (2010) descreveram aumentos na produção de EROs, na atividade da via alternativa do complemento e na atividade de lisozima quando alimentando *Paralichthys olivaceus* com duas cepas comerciais de *Lactobacillus*.

Tabela 2: Relação entre a concentração de mananoligossacarídeo na dieta e seus efeitos sobre, principalmente, o sistema imune dos peixes.

Peixe	Inclusão na dieta	Efeitos	Referência
<i>Onchorinchus mykiss</i>	2gkg-1	Aumento do Crescimento e da sobrevivência. Aumento da titulação de anticorpos e atividade de lisozima	Staykov et al.(2007)
<i>Onchorinchus mykiss</i>	0 e 4 g kg-1, 12 semanas	Aumento do crescimento, das atividades hemolíticas e fagocíticas, quantidade de muco e sobrevivência a <i>Vibrio anguillarum</i>	Rodrigues-Estrada et al.(2008)
<i>Tilápia híbrida</i>	0, 2 e 6 g kg-1, 58 dias	Aumento na sobrevivência e em respostas inatas	He et al.(2003)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0, 2, 4, e 6 g kg-1, 3 semanas	Aumento de peso, tamanho e ganho de peso diário dos peixes alimentados com 4 e 6 g. Aumento da sobrevivência contra <i>Streptococcus agalactiae</i>	Samrongpan et al.(2008)
<i>Dicentrarchus Labrax</i>	8 semanas	Diminuição da translocação de patógenos para órgãos hematopoiéticos e aumento da superfície da mucosa intestinal	Torrecillas et al. (2011)
<i>Onchorinchus mykiss</i>	111 dias para subadultos e 58 dias para juvenis	Aumento da área do epitélio intestinal. Nos subadultos houve um aumento da quantidade de <i>Lactobacillus</i> , enquanto que para os juvenis houve uma diminuição. Nos juvenis houve uma diminuição da quantidade de <i>Aeromonas/Vibrio</i> spp.	Dimitroglou et al. (2009)
<i>Sciaenops ocellatus</i>	1%, 8 semanas	Aumento da lisozima. Diminuição da sobrevivência	Zhou et al. (2010)
<i>Labeo rohita</i>	1, 2 e 4%, 60 dias	Aumento da produção de EROs, do número de células brancas e da sobrevivência a desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i>	Andrews et al. (2009)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	2 e 4%	Aumento da resistência à infecção por <i>Vibrio alginolyticus</i>	Torrecillas et al. (2007)

e. Referências

- AAKRE, R.; WERGELAND, H.I.; AASJORD, P.M.; ENDRESEN, C. 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing β -1,3-M-Glucan as adjuvant. *Fish and Shellfish immunology*, 4, 47-61.
- ABELLI L., RANDELLI E., CARNEVALI O., PICCHIETTI S. 2009. Stimulation of Gut Immune System by Early Administration of Probiotic Strains in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Annals of the N.Y. Academy of Science*. (1163) 340–342.
- AI Q., MAI K., ZHANG L., TAN B., ZHANG W., XU W., LI H. 2007. Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 394-402.
- ALEXANDER J.W. 1975. Antibiotic agents and the immune mechanisms of defense. *Bulletin of the New York Academic Medicine*, 51, 1039-1045. In: Rijkers G.T.; Van Oosterom R.; Van Muiswinke W.B. 1981. The immune system of cyprinid fish, oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2, 281-290.
- ANDREWS S.R., SAHU N.P., PAL A.K., KUMAR S. 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquaculture Research*, 41, pp. 61–69.
- ARIIZUMI, K.; SHEN ,G.; SHIKANO , S.; RITTER, R.; ZUKAS, P.; EDELBAUM, D.; MORITA, A.; TAKASHIMA, A. 2000. Cloning of a second dendritic cell-

associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 11957–11963.

BAGNIA, M.; ROMANO, N.; FINOIAM.G., ABELLI L., SCAPIGLIATI G., TISCAR P.G., SARTI M.; MARINO, G. 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeastb-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, 18, 311-325.

BARTON, B.A & 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*, 10, 03-26.

BARTON, B.A. 1997. Stress in finfish: Past present and future- a historical perspective. In: *Fish stress and health in aquaculture*. IWAMA G.K.; PICKERING, AD.; SUMPTER, J.P.; SHRECK, C. B (Editors), Cambridge University Press. Cambridge, 1-33.

BAURHOO B., PHILLIP L., RUIZ-FERIA C.A. 2007. Effects of Purified Lignin and Mannan Oligosaccharides on Intestinal Integrity and Microbial Populations in the Ceca and Litter of Broiler Chickens. *Poultry Science* (86) pp 1070–1078.

BINURAMESH C., PRABAKARAN M., STEINHAGEN D., MICHAEL R. D. 2006. Effect of sex ratio on the immune system of *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Brain Behavior and Immunology* 20, 300–308.

BONALDO,A.; THOMPSON, K.D.; MANFRIN, A.; ADAMS, A.; MURANO, E.; MORDENTI, A.G.; GATTA, P.P. 2007. The influence of dietary β -glucans on the adaptive and innate immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 151-164.

- BRIDLE, A.R.; CARTER, C.G.; MORRISON, R.N.; NOWAK, B.F. 2005. The effect of β -glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease evidence of inherent resistance. *Journal of Fish Diseases*, 28, 347–356.
- BROWN, G.D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews in Immunology*, 6, 33-43.
- BROWN, G.D., TAYLOR P.R., REID D.M., WILLMENT J.A., WILLIAMS D.L., MARTINEZ-POMARES L., WONG S.Y.C., AND GORDON S. 2002. Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 196:407–412.
- CAIN, K.D.; GRABOWSKI, L.; REILLY, J.; LYTWYN, M. 2003. Immunomodulatory effects of a bacterial-derived β -1,3 glucan administered to tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in a Spirulina-based diet. *Aquaculture Research*, 34, 1241-1244.
- CAMBI A., KOOPMAN M., FIGDOR C.G. 2005. Microreview: How C-type lectins detect pathogens. *Cellular Microbiology* 7(4), 481–488.
- CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. 1999. Effect of different beta-glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 529–541.
- CHAKA W., VERHEUL A.F.M., VAISHNAV V.V. , CHERNIAK R., SCHARRINGA J., VERHOEF J., SNIPPE H., HOEPELMAN A.I.M. 1997. Induction of TNF- α in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by the Mannoprotein of *Cryptococcus neoformans* Involves Human Mannose Binding Protein. *The Journal of Immunology*. 159 (6) 2979-2985.

- CHOUBERT, G., DE LA NOÛE, J., LÉSEL, R. 1991a. Effects of dietary fat levels and antibiotics (Flumequine + Gentamycin) on nutrient digestibility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquatic Living Resources*, 4, 147–153.
- CHOUBERT, G.; DE LA NOÛE, J.; BLANC, J.M. 1991b. Apparent digestibility of canthaxantin in rainbow trout: effect of dietary fat level, antibiotics and number of pyloric caeca. *Aquaculture*, 99, 323–329.
- COOK M.T., HAYBALL P.J., HUTCHINSON W., NOWAK B.F. AND HAYBALL J.D. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider) in winter. *Fish & Shellfish Immunology*, 14, 333–345.
- COOK, M.T.; HAYBALL, P.J., HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, A.D. 2001. The efficacy of a commercial-glucan preparation, EcoActiva, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 661–672.
- COUSO N., CASTRO R., MAGARIÑOS B., OBACH A, LAMAS J. 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*. V. 219, I.1–4, P 99–109.
- COYNE R., HJELTNES B., BERGH Ø., ANDERSEN K., RUDRA H., SMITH P. 2004. Quantitative properties of data generated by the examination of *Aeromonas salmonicida* infected fish by the standard bacteriological loop. *Aquaculture*, 236, pp. 27–35.
- CRAVEDI, J.P.; CHOUBERT, G.; DELOUS, G. 1987. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture*, 60, 133–141.

- CROSS, M.L. 2002. Microbes versus microbes: Immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS. Immunology and Medical. Microbiology.*, 34: 245-253.
- CROUCH, E & WRIGHT, J.R. 2001. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annual Reviews in Physiology*, 63, 521–554.
- DIMITROGLOU, A.; DAVIES, S.J.; SWEETMAN, J.; DIVANACH, P.; CHATZIFOTIS, S. 2009. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquaculture Research* 41, 245–251.
- DOLLERY, C. 1999. Gemfibrozil . In: Therapeutic Drugs. Dollery C. Eds, UK: Churchill Livingstone, Edinburgh (UK), G34–G37.
- ELLIS, A.E, 1990. Serum antiproteases in fish and lysozyme assays. In: J.S. STOLEN, FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON.; B.S.; VAN MUISWINKEL, W.B. (Editors), *Techniques in Fish Immunology.*, SOS Publications, Fair Haven NJ, 95–103.
- ENGSTAD, R.E & ROBERTSEN, B. 1993. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Developmental Comparative Immunology*, 17,319-330.
- FERNANDES, M.O. 1997. Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes. Dissertação (Mestre em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 106p.
- FRANKEL, E.N. 1995. Oxidation of polyunsaturated lipids and its nutritional consequences. In: Castenmiller W.A.M (Editor). *Proceedings of the 21st world congress of the international society for fat research*. England: P.J. Barnes and Associates; 265-269.

- GALLI, L.F & TORLONI, C.E. 1986. Criação de Tilápias. In: Criação de Peixes. São Paulo, Nobel, 3.ed., 74-85.
- GOODRIDGE, H.S.; WOLF, A.J.; UNDERHILL, D.M. 2009. β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunological Reviews*, 230, 38-50.
- GOPALAKANNAN, A & ARUL, V. 2010. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. *Aquaculture Research*, 41(6) 884-892.
- HARIKRISHNAN R., BALASUNDARAMB C., HEO M-S. 2010. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish & Shellfish Immunology*, (29) pp 868-874.
- HE, S.; XU, G.; WU, Y.; WENG, H. ; XIE, H. 2003. Effects of IMO and FOS on the growth performance and non-specific immunity in hybrid tilapia. *Chinese Feed*, 23, 14-15.
- HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C. 2003. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annual Reviews in Immunology*, 21, 547–578.
- JORY D.E.; ALCESTE C.; CABRERA, T.R. 2000. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte América. *Panorama Acuicola*, Sonora, 5(5), 50-53.
- KELLY, K.A.; HAVRILLA, C.M.; BRADY, T.C.; ABRAMO, K.H.; LEVIN, E.D. 1998. Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. *Environmental Health Perspectives*, 106, 375–384.
- KILPATRICK, D.C. 2002. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572, 401–413

- KISHORE U., GREENHOUGH T.J., WATERS P., SHRIVE A.K., GHAI R., KAMRAN M.F., BERNAL A.L., REID K.B., MADAN T., CHAKRABORTY T. 2006 Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Molecular Immunology*. 43,1293–1315.
- KOPPEL E.A., VAN GISBERGEN K.P.J.M., GEIJTENBEEK T.B.H., VAN KOOYK Y. 2005. Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cellular Microbiology*. 7 (2) pp 157–165.
- KRUTZIK, S. R.; TAN, B.; LI, H.; OCHOA, M. T.; LIU, P. T.; SHARFSTEIN, S. E.; GRAEBER, T. G.; SIELING, P. A.; LIU, Y. J.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nature Medicine*, 11, 653–660
- LAI, W.K.; SUN, J.P.; ZHANG, J.; JENNINGS, A.; LALOR, P.F.; HUBSCHER, S.; JANE A. MCKEATING, J.A. 2006. Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *The American Journal of Pathology*. 169, 200–208
- LEVY S.B & MARSHALL B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10, 122–129.
- LI P., WEN Q., GATLIN III D.M. 2009. Dose-dependent influences of dietary β -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*. *Aquaculture Research*, 40,1578-1584.
- LIVELY, C.M.; CRADDOCK, C.; VRIJENHOEK, R.C.1990. Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish. Letters to Nature. *Nature*. 344. 864:866.

- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106, 201-212.
- MCKENZIE, E.J.; TAYLOR, P.; STILLION, R.J.; LUCAS, A.D.; HARRIS, J.; GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L. 2007. Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *Journal of Immunology*, 178, 4975–4983.
- MEDZHITOV, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 819-826.
- MISRA, C.K., DAS B.K., MUKHERJEE S.C., PATTAIK P. 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255(1).
- MÜLLER, A.; RICE, P.J.; ENSLEY, H.E.; COOGAN, P.S.; KALBFLEISCH, J.H.; KELLEY, J.L.; LOVE, E.J.; PORTERA, C.A.; HÁ, T.; BROWDER, I.W.; WILLIAMS, D.L. 1996. Receptor binding and internalization of a water-soluble (1-3)- β -D-glucan biologic response modifier in two monocyte/macrophage cell lines. *The Journal of Immunology*, 156, 3418–3425.
- NOGA E.J. 2010. *Fish Disease: Diagnoses and treatment*. Second edition. Wiley-Blackwell. 382-383.
- OYOFO, B.A.; DELOACH, J.R.; CORRIER, D.E.; NORMAN, J.O.; ZIPRIN, R.L.; MOLLENHAUER, H.H. 1989a. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Science*. 68:1357–1360.
- OYOFO, B.A.; DROLESKEY, R.E.; NORMAN, J.O.; MOLLENHAUER, H.H.; ZIPRIN R.L.; CORRIER, D.E., DELOACH, J.R. 1989b. Inhibition by mannose

of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella*. *Poultry Science*. 68:1351–1356.

PANIGRAHI A., VISWANATH K., SATOH S. 2011. Real-time quantification of the immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture Research*, (42) pp 906-917.

PAULSEN, S. M., LUNDE, H., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. 2003. In vivo effects of β - glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.*, 14, 39-54.

PHIBRO. 2012. Tm700. Ficha Técnica. www.phibro.com.br/ft/TM_700.FT.pdf

PIETRELLA, D.; CORBUCCI, C.; PERITO, S.; BISTONI, G.; VECCHIARELLI, A. 2005. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infection and Immunity*, 73, 820–827.

PIOLETTI M., ÈNZEN F.S., HARMS J., ZARIVACH R., GLUEHMANN M., AVILA H., BASHAN A, BARTELS H., AUERBACH T., JACOBI C., HARTSCH T., YONATH A., FRANCESCHI F.E. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *The EMBO Journal*, 20(8), 1829-1839.

PIOLETTI, M.; ÈNZEN, F.S.; HARMS, J.; ZARIVACH, R.; GLUÈHMANN, M.; AVILA, H.; BASHAN, A; BARTELS, H., AUERBACH, T.; JACOBI, C., HARTSCH, T.; YONATH, A.; FRANCESCHI, F.E. 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *The EMBO Journal*, 20(8), 1829-1839.

POPMA, T.J & LOVSHIN, L. L.1995. Worldwide Prospects for Commercial Production of Tilapia. *International Center for Aquaculture and Aquatic*

Environments Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, Alabama, 36849.

- REID, G.; WALLANT, N.G.; PATEL, R.; ANTONIC, A.; SAXON-ALIIFAALOGO F.; CAO, H.; WEBSTER, G.; WATSON, J.D. 2009. Potent subunit-specific effects on cell growth and drug sensitivity from optimised siRNA-mediated silencing of ribonucleotide reductase. *Journal of RNAi Gene Silencers*, 5(1), 321-330.
- RIJKERS, G.T.; TEUNISSEN, A.G.; VAN OOSTEROM, R.; VAN MUISWINKEL W.B. 1980. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 19, 177-189.
- RIJKERS, G.T.; VAN OOSTEROM, R.; VAN MUISWINKE, W.B. 1981. The immune system of cyprinid fish, oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2, 281-290.
- RODRIGUES-ESTRADA, U.; SATOH, S.; HAGA, Y.; FUSHIMI, H.; SWEET-MAN, J. 2008. Studies of the effects of Mannan-oligosaccharides, *Enterococcus faecalis* and Poly Hydrobutyric Acid as Immune Stimulant and Growth Promoting Ingredients in Rainbow Trout Diets. *5th World fisheries Congress, Yokohama, Japan, October 20–25. Abstract 2d-1-5, 158p.*
- RODRÍGUEZ A., ESTEBAN M.A., MESEGUER J. 2003. A mannose-receptor is possibly involved in the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 14 (5) pp 375–388.
- SAHOO P.K & MUKHERJEE S. C. 2001. Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced

immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 683–695.

SAMRONGPAN, C.; AREECHON, N.; YOONPUNDH, R.; SIRSAPOOME, P. 2008.

Effects of mannan-oligosaccharides on growth, survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) fry.
http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/ISTA8/Abstracts_Papers/Chinnapat's%20full%20paper-Thailand.doc.

SATO, K.; YANG, X.L.; YUDATE, T.; CHUNG, J.S.; WU, J.; LUBY-PHELPS, K.;

KIMBERLY, R.P.; UNDERHILL, D.; CRUZ JR, P.D.; ARIIZUMI, K. 2006.
Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 38854–38866.

SERRANO-GÓMEZ, D.; DOMÍNGUEZ-SOTO, A.; ANCOCHEA, J.; JIMENEZ-

HEFFERNAN, J.A.; LEAL, J.A.; CORBÍ, A.L. 2004 . Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *Journal of Immunology*, 173, 5635–5643

SIMS M.D., DAWSON K.A., NEWMAN K.E., SPRING P., HOOGE D.M. 2004.

Effects of Dietary Mannan Oligosaccharide, Bacitracin Methylene Disalicylate, or Both on the Live Performance and Intestinal Microbiology of Turkeys. *Poultry Science*, (83) pp 1148–1154.

SIWICKI, A. K. 1989. Immunostimulating influence of levamisole on non-specific

immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Developmental & Comparative Immunological*. 13, 87-91.

- SPAHN C.M.T., PRESCOTT C.D. 1996 Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *Journal of Molecular Medicine* 74, 423–439.
- SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. 2000. The Effects of Dietary Mannan oligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of *Salmonella*-Challenged Broiler Chicks. *Poultry Science*, 79,205–211.
- STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 15, 153–161.
- TAILLEUX, L.; PHAM-THI, N.; BERGERON-LAFAURIE, A.; HERRMANN, J.L.; CHARLES, P.; SCHWARTZ, O.; SCHEINMANN, P.; LAGRANGE P. H.; DE BLIC, J.; TAZI, A.; GICQUEL, B.; NEYROLLES, O. 2005. DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS Med*, 2 (12), e381.
- TAYLOR, P. R.; REID, D. M.; HEINSBROEK, S.E.; BROWN, G. D.; GORDON,S.; WONG, S. Y. 2005. Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited in vivo. *European Journal of Immunology*, 35, 2163– 2174
- TOFTEN, H & JOBLING, M. 1997. Feed intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed diets supplemented with oxytetracycline and squid extract. *Aquaculture Nutrition*, 3, 145-151.
- TORRECILLAS S., MAKOL A., CABALLERO M.J., MONTERO D., GINÉS R., SWEETMAN J., IZQUIERDO M. 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannam oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*, 17, pp. 223–233.

- TORRECILLAS S., MAKOL A., CABALLERO M.J., MONTERO D., ROBAINA L., REAL F., SWEETMAN J., TORT L., IZQUIERDO M.S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.* 23 (5) pp 969-81.
- TORRECILLAS S., MAKOL A., BENÍTEZ-SANTANA T., CABALLERO M.J., MONTERO D., SWEETMAN J. & IZQUIERDO M.S. 2011. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Fish & Shellfish Immunology*, 30, 674–681.
- TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M.J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M.S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shelfish Immunology*, 23(5), 969-981.
- TSINAS, A. C.; KYRIAKIS, S. C.; LEIWAS, S.; SARRIS, K.; BOURTZT-HATZOPOULOU, E.; SAOULIDI, K.1998. Control of Proliferative Enteropathy in Growing/Fattening Pigs Using Growth Promoters. *Journal of Veterinary Medicine*, 45, 115-127.
- TSONI S.V., BROWN G.D. 2008. β -Glucans and Dectin-1. *Annals of New York Academic Sciences*, 1143, 45-60.
- VAN KOOYK, Y & GEIJTENBEEK, T.B. 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 3, 697–709.
- VAN VALEN, L. 1973."A New Evolutionary Law". *Evolutionary Theory*, 1, 1-30.
- VAUTIER, S.; MACCAULLUM, D.M.; BROWN, G.D. 2011. C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. *Cytokine*, 58(1), 89-99.

- VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245, pp 149-161.
- VIOLA S., ARIELI Y. (1987) Non hormonal growth promoters for tilapia and carp. I. Screening test in cages. *Israeli Journal of Aquaculture*, 39, 31–38. em Toften H., Jobling M. (1997). Feed intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed diets supplemented with oxytetracycline and squid extract. *Aquaculture Nutrition*, 3, 145-151.
- WAKSHULL, E.; BRUNKE-REESE, D.; LINDERMUTH, J.; FISETTE, L.; NATHANS, R.S.; CROWLEY, J.J.; TUFTS, J.C.; ZIMMERMAN, J.; MACKIN, W.; ADAMS, D.S. 1999. PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor. *Immunopharmacology*, 41, 89–107.
- WEDEMEYER G.A., BARTON B.A., MCLEAY D.J. 1990. STRESS AND ACCLIMATION. IN: SCHRECK C.B., MOYLE P.B. (Editors). *Methods for Fish biology. American Fisheries Society*, 451-489.
- WEDEMEYER, G.A.1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman & Hall, Nova York. In: CYRINO J.E.P, URBINATTI E.C, FRACALOSI D.M., CASTAGNOLLI N.(2004) (Editores). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo. TecArt.
- WENDELAAR BONGA S.E. 1997. Stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591-625.

- WEYTS, F.A.A.; VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L.; FLIK, G.1998. Characterization of glucocorticoid receptor in peripheral blood leukocytes of carp, *Cyprinus carpio* L. *General and comparative endocrinology*, 111, 1-8.
- WHITTINGTON, R., LIM, C., KLESIUS, P.H. 2005. Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 248, 217–225.
- WILLMENT J.A., BROWN G.D. 2007. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends in Microbiology*. Vol.16. n°1.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva: WHO; 2001. WHO document WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.
- YANG Y., IJI P.A., CHOCT M. 2009. Gut microflora and alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal*. Vol. 65.
- YONARA, M.E., YONAR, S.M.; SILICI, S. 2011. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Fish & Shellfish Immunology*, 31, 318-325.
- ZANIBONI FILHO, E. 2004. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In: Poli C.R.; Poli A.T.B.; Andreatta, E.; Beltrame, E. (Editores) *Aqüicultura: Experiência Brasileira*. Multitarefa, Florianópolis, 309-336.
- ZHANG , J.; ZHU, J.; IMRICH, A.; CUSHION, M.; KINANE, T. B.; KOZIEL, H. 2004. Pneumocystis activates human alveolar macrophage NF- κ B signaling through mannose receptors. *Infection and Immunity*, 72, 3147–3160
- ZHOU Q-C., BUENTELLO J.A., GATLIN III D.M. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309 pp 253–257.

- ZHOU X.-Q.; LI Y.-L. (2004) The effect of Bio-Mos on intestinal microflora and immune function of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian). In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium (Suppl. 1: Abstracts of posters presented)*. 24–26, p. 109.
- ZOCCARATO, I.; GASCO, L.; LEVERONI CALVI, S.; FORTINA, R.; BIANCHINI, M.L.; ROLLIN, X. 1995. Effect of dietary avoparcin on performances and carcass composition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 26, 361-366. In: Toften, H.; Jobling, M. 1997. Feed intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed diets supplemented with oxytetracycline and squid extract. *Aquaculture Nutrition*, 3, 145–151.

**3. Experimento I: EFEITO DA INCLUSÃO DIETÉTICA DE β -
GLUCANO E OXITETRACICLINA NAS RESPOSTAS
HEMATOLÓGICA E IMUNOLÓGICA E NO DESEMPENHO
PRODUTIVO DE TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)
CRIADAS EM TANQUES REDE**

Resumo

Visando encontrar possíveis substitutos para a utilização de antimicrobianos de modo profilático na dieta pré-manejo de peixes, o presente trabalho teve como objetivo comparar a inclusão de 0,1% de β -glucano (MacroGard®, Biorigin) com 0,83% de oxitetraciclina (Tm700®, Phibro) na dieta de tilápia-do-nilo por 14 e 7 dias, respectivamente, criadas em tanques rede, tendo como estímulo estressante o manejo de classificação (separação dos peixes de acordo com o tamanho). Foram realizadas amostragens no dia da classificação e após 7, 14 e 28 dias. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nas análises hematológicas, bioquímicas, no cortisol sérico e na atividade respiratória de leucócitos (*burst* oxidativo). O ganho de peso médio diminuiu nos peixes alimentados com a ração medicada. A taxa de crescimento específico (TCE) no grupo alimentado com a ração medicada foi menor que a do grupo controle, no entanto, a TCE do grupo que alimentado com ração contendo β -glucano apresentou valor intermediário entre os dois grupos anteriores (ração medicada e controle), porém, sem diferença estatística. O consumo não diferiu significativamente entre os grupos, porém a conversão alimentar foi menor nos peixes alimentados a ração medicada e com o β -glucano. A mortalidade nos grupos alimentados com a ração medicada e com o β -glucano não diferiram entre si, sendo ambas menores que a do controle. Os resultados deste estudo demonstram que a inclusão de 0,1% de β -glucano na dieta de tilápia-do-nilo melhorou os índices produtivos dos peixes quando comparado com a inclusão de 0,83% de oxitetraciclina, pois a taxa de mortalidade não diferiu entre os tratamentos e foi menor que a do grupo controle e, ainda, o imunoestimulante evitou a redução do ganho de peso médio.

Palavras-chave: imunoestimulante, antimicrobiano, saúde, produtividade, tilápia-do-nilo.

Abstract

Objecting to find possible substitutes to the prophylactic antibiotics utilization in pre handling fish diets, in the present assay we compared the inclusion of 0.1% of β -glucan (Beta) (MacroGard®, Biorigin) with 0.83% of oxitetracycline (Oxi) (Tm700®, Phibro) in Nile tilapia diets, for 14 and seven days, respectively, reared in net cages, right after the classification handle (separation of the fish by size). The samples were made at the day of classification and at seven, 14 and 28 days after. We could not observe statistical differences among the treatments in the hematological or biochemical analysis, in the serum cortisol or in the respiratory burst assay. The average weight gain decreased in the antibiotic fed fish. The specific growth rate (TCE) in the antibiotic group presented was lower in relation with the control group, however, no differences were found between the β -glucan fed group and the others. The consumption did not differ statistically, but the feed conversion rate (CA) was lower in the fish fed with Beta and Oxi. The mortality in the treated fish did not differ statistically, but both groups presented lower mortality than the control group. Our results showed that the β -glucan inclusion at 0.1% in Nile tilapia diets made the productive indices better than the 0.83% oxytetracycline inclusion and, moreover, the immunostimulant avoid the reduction in the average weight gain GPM

Key words: immunostimulant, antibiotic, health, productivity, Nile tilapia.

a. Introdução

O estresse ainda é um desafio na aquicultura mundial, não apenas pela diminuição da produtividade, mas, principalmente, por possibilitar o aparecimento de enfermidades devido a seus efeitos nocivos sobre o sistema imune, tanto inato quanto adaptativo. Na tentativa de evitar este problema, os aquicultores lançam mão de massivas quantidades de antimicrobianos, como medida terapêutica ou em doses diferentes das recomendadas, intentando a profilaxia de bacterioses oportunistas. Porém os resultados não são promissores, pois peixes com o sistema imune suprimido e/ou estressados comem quantidades bem menores de alimento que o recomendável, diminuindo a eficiência de tais drogas e aumentando demasiadamente os custos de produção. Tão prejudicial quanto a queda na lucratividade é a quantidade de antimicrobianos e seus metabólitos no ambiente, seja pela excreção ou por contato direto com o alimento e com a água. O aparecimento de cepas bacterianas resistentes a uma ou mais drogas, incluindo à oxitetraciclina já se tornou uma grande ameaça à saúde pública (Levy & Marshal, 2004).

Visando minimizar perdas econômicas com mortalidade de peixes e gastos com medicamentos, além de prejuízos à saúde, pesquisadores de vários países tentam desenvolver técnicas de produção sustentável, reduzindo ou evitando a utilização de antimicrobianos na alimentação animal. Entre as substâncias utilizadas no manejo profilático na aquicultura e em outras criações (aves e suínos), estão os glucanos, mais especificamente o β -1,3-glucano, extraído da parede celular de leveduras (*Saccharomices cerevisae*) e, que através de estímulos a receptores do sistema imune inato, é capaz de promover uma barreira eficiente contra organismos invasores.

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial de substituição da oxitetraciclina pelo β -1,3-glucano na criação de tilápia-do-nilo em tanques-rede de maneira profilática, após um estímulo estressante (classificação dos peixes), através de parâmetros hematológicos, imunológicos, bioquímicos e de desempenho produtivo.

b. Material e Métodos

Peixes e alimentação

O experimento foi realizado em uma piscicultura comercial localizada às margens do rio Tietê, na cidade de Arealva, São Paulo, Brasil. Foram utilizados doze tanques-rede de 18m², contendo aproximadamente seis mil tilápias-do-nilo (150 g), revertidas sexualmente, cada um caracterizando uma unidade experimental. Os tanques-rede foram divididos em três grupos, de acordo com a dieta fornecida: quatro receberam uma dieta contendo a inclusão de 0,1% de β -glucano (MacroGard®, Biorigin, Lençóis Paulista, São Paulo, Brasil) durante 14 dias, outros quatro receberam uma dieta medicada, contendo 0,83% de oxitetraciclina (Tm-700®, Phibro, Guarulhos, São Paulo, Brasil), contendo 70% de oxitetraciclina em sua formulação por sete dias e os outros quatro receberam uma dieta controle (dieta basal comercial com 32% proteína), isenta de antimicrobiano e imunoestimulante (Tabela 2). Após o período de alimentação de sete (oxitetraciclina) e 14 dias (β -glucano), os peixes dos dois grupos experimentais passaram a receber a mesma ração do grupo controle. Os três grupos experimentais foram submetidos ao manejo de classificação (biometria) no dia anterior ao início da colheita sanguínea e, após a primeira amostragem, os peixes começaram a ser alimentados duas vezes ao dia, às 9:00 e às 15:00 h, com as rações experimentais com 3% da biomassa estimada.

As três dietas experimentais seguiram a formulação convencional de uma fábrica de ração comercial (Nutreco-Fri-Ribe). A primeira dieta foi formulada de acordo com as exigências da tilápia em crescimento e 0,1% de β -glucano (MacroGard®), foi incluído na dieta. O mesmo procedimento foi adotado para a ração com antimicrobiano, utilizando a mesma formulação, todavia, foi incluído na dieta 0,83% de oxitetraciclina (Tm700®). A dieta controle seguiu a mesma formulação, todavia, isenta da inclusão de imunostimulante ou antimicrobiano.

Tabela 3: Níveis de garantia da formulação comercial utilizada no experimento

Níveis de Garantia (quantidade por kg de ração)			
Umidade**	120g	Colina*	800mg
Proteína Bruta (Mínimo)	320g	Ácido Fólico*	5,4mg
Extrato Etéreo*	60g	Niacina*	112,5mg
Matéria Mineral**	110g	Biotina*	0,58mg
Matéria Fibrosa**	70g	Ácido Pantotênico*	36mg
Cálcio	10 - 30g	Vit A*	9000U.I.
Fósforo*	6000mg	Vit B1*	20,25mg
Magnésio*	31,25mg	Vit B12*	22,5 μ g
Zinco*	100mg	Vit B2*	20,25mg
Cobre*	25mg	Vit B6*	20,25mg
Ferro*	62,5mg	Vit C*	300mg
Manganês*	62,5mg	Vit D3*	3150U.I.
Cobalto*	0,6mg	Vit E*	135U.I.
Iodo*	1,25mg	Vit K3*	9mg
Selênio*	0,25mg	Inositol*	80,g

*Mínimo. **Máximo

Tabela 4. Composição química do MacroGard® segundo o fabricante

Ingrediente	Quantidade
* β -glucanas %	Mín. 60,0
*Proteína Bruta %	Máx. 8,0
*pH (solução 10%)	4,0 - 7,0
*Cinzas %	<10,0

Distribuição do tamanho de partícula

Média	41 μ m
<20 μ m	19%
20 - 50 μ m	43%
51 - 100 μ m	28%
101 - 200 μ m	10%
>200 μ m	0
Fluidez (seg)	70
Ângulo de repouso (graus)	31
Compressibilidade %	37
Capacidade de retenção de água (média)	7,4
Índice de solubilidade em água	7,9

MacroGard® (Biorigin), é um aditivo para alimentação animal rico em β -1,3/1,6 glucanas purificadas extraídas da leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) de uma cepa selecionada e patenteada (Boletim Técnico da Biorigin, 2012).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de Jaboticabal, sob o protocolo de número 22.517/10, estando de acordo com os Princípios Éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Amostragem

Foram realizadas quatro amostragens, a primeira antes do início da alimentação com as dietas experimentais e outras três após, sete, 14 e 28 dias de alimentação. Sete peixes de cada tanque-rede foram anestesiados em solução de benzocaína (1 g de benzocaína para

10 L de água). Cerca de 3,0 mL de sangue periférico foi colhido por punção do vaso caudal, e dessa quantidade, cerca de 0,3 mL foi armazenado em tubo plástico de 2 mL contendo 15 µL de heparina (1:50) e 0,3mL dispensado em tubo plástico de 2 mL contendo Glistab[®]. O restante foi dispensado em tubo de vidro para coagulação por 45 minutos à temperatura ambiente. Após este período, o sangue coagulado foi centrifugado a 1500 G por cinco minutos, e o soro foi armazenado em ultrafreezer (-70 °C).

Desempenho Produtivo

Os peixes foram pesados um dia antes do início do experimento, isto é, antes do início da alimentação com as dietas experimentais e, novamente no 163º dias (135 dias após a última amostragem). A pesagem foi realizada da seguinte maneira:

- Em um puçá, 15 peixes eram capturados e pesados;
- Fazia-se a média de peso desses peixes, repetindo o processo 15 vezes por tanque rede;
- Utilizando os mesmos puçás, pesava-se apenas o restante dos peixes do tanque-rede, estimando a quantidade pelo peso médio de cada indivíduo.

A avaliação do desempenho produtivo foi realizada de acordo com as equações:

- ***Ganho de Peso (GP):***

$$GP = \text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}$$

- ***Ganho de Peso Médio (GPM):***

$$GPM = GP / N^{\circ} \text{ de Peixes}$$

- ***Conversão Alimentar (CA):***

$$CA = (\text{Quantidade de alimento consumido durante todo o período}) / GP$$

- ***Taxa de Crescimento Específico (TCE):***

$$\text{TCE} = [\ln(\text{Peso Final}) - \ln(\text{Peso Inicial})] / \text{N}^\circ \text{ de dias}$$

- *Sobrevivência Relativa:*

Sobrevivência = número inicial de peixes / número final de peixes x 100

- *Mortalidade Relativa:*

Mortalidade = 100 - Sobrevivência Relativa.

Hematologia

Para a determinação da quantidade de eritrócitos, foi utilizado 10µL de sangue com anticoagulante e mesclado a 2,0 mL de formol citrato e, posteriormente, os eritrócitos totais foram contados em câmara de Neubauer. O hematócrito foi determinado através da centrifugação do sangue contendo anticoagulante em centrífuga de microhematócrito a 1500 G por cinco minutos (Goldenfarb et al., 1971). A determinação da quantidade de hemoglobina presente no sangue foi realizada através do método da cianometahemoglobina (Collier, 1944). As extensões sanguíneas foram coradas com MG-G-W (May-Grünwald-Gyemsa-Writh) para posterior contagem total e diferencial de trombócitos e leucócitos (Hrube & Smith, 1998). Foram utilizadas as equações hematimétricas de acordo com Wintrobe (1934) para a determinação do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Atividade respiratória de leucócitos do sangue

O ensaio de atividade respiratória de leucócitos (burst oxidativo) foi realizado de acordo com Anderson & Siwichi (1995), modificado por Biller-Takahashi (2008). 100 µL de sangue contendo anticoagulante foram adicionados em 100 µL de tampão fosfato (pH 8.4) contendo nitroazul de tetrazolium (NBT), na proporção de uma pastilha para cada 5

mL de tampão. Após incubação por 30 minutos, 50 µL desta solução foi adicionada a 1 mL de N,N-dimetilformamida, agitado, centrifugado a 450 rpm por 5 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro (540 nm, absorbância).

Glicose plasmática

A glicose foi determinada através de kit comercial (LabTest®), em ensaio colorimétrico. 10 µL de plasma sanguíneo foram pipetados em 1 mL de reagente, mantido em temperatura ambiente durante 15 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro (505 nm).

Proteína total plasmática

A proteína total plasmática foi determinada através de kit comercial (LabTest®). A determinação colorimétrica das proteínas totais resume-se na reação das proteínas do plasma (ou soro, preferencialmente) com os íons de cobre presente na solução alcalina (reagente de biureto) através das ligações peptídicas. A solução de reagente contendo 50µL de plasma foi medida em espectrofotômetro a 545nm.

Cortisol

Para a análise do cortisol sanguíneo, foi utilizado soro previamente extraído através da técnica de radioimunoensaio (Kit Coat-a-count, DPC). O soro dos peixes foi incubado por 45 minutos a 37°C com um identificador de cortisol, em tubos de ensaio revestidos com anticorpos anti-cortisol. Após a decantação, a radiação nos tubos foi medida e comparada com a dos padrões, formando uma curva de leitura.

Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. Em caso de diferença estatística ($p < 0,05$), foram apresentadas médias acompanhadas de desvio padrão.

c. Resultados

Durante todo o período experimental a temperatura da água variou entre 18 e 23°C, com média de 21,5 °C e o oxigênio dissolvido foi de aproximadamente 4,6 mg.dL⁻¹.

Desempenho produtivo

Os peixes foram pesados 135 dias após a última amostragem. Os tratamentos influenciaram todos os parâmetros de desempenho produtivo. Os peixes alimentados com a dieta acrescida de β -glucano obtiveram o mesmo ganho de peso médio que os alimentados com a dieta controle, 610 e 592,75g, respectivamente, sendo ambos os valores superiores ao do grupo alimentado com a ração medicada 422,75g (Figura 6).

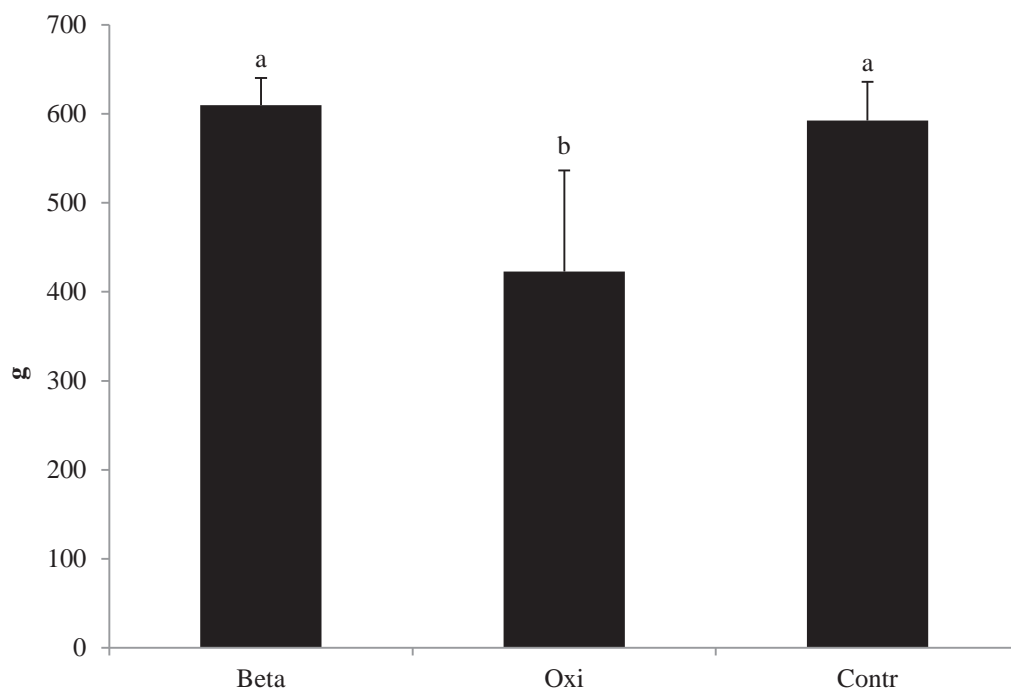


Figura 6: Ganho de peso médio (GPM). P = 0,0207

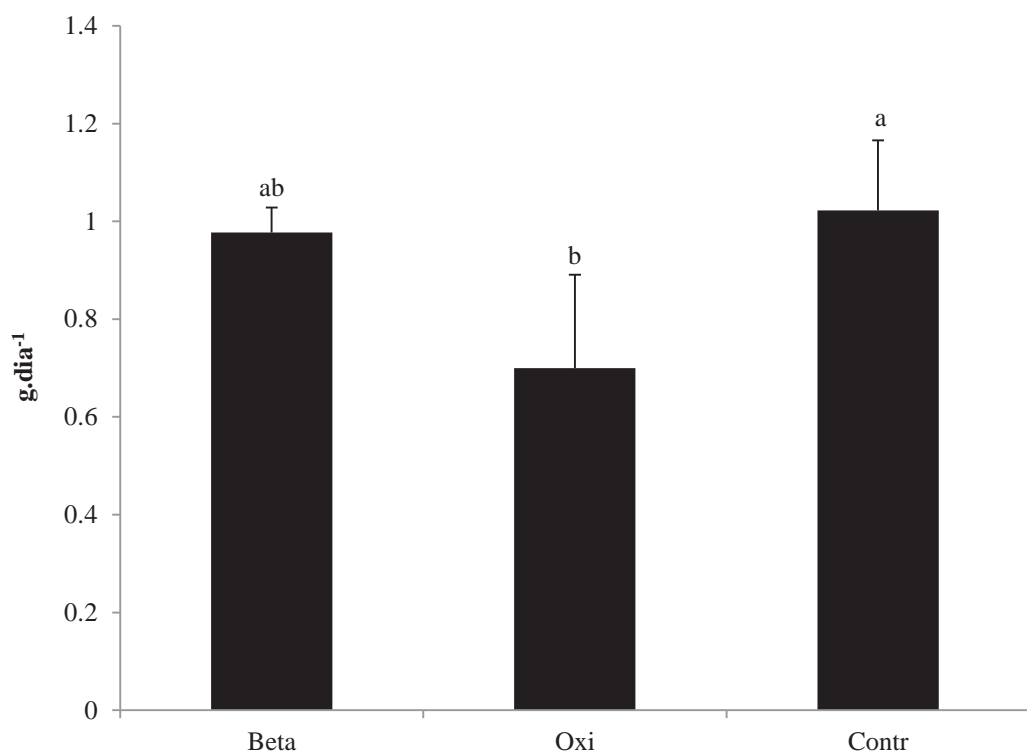


Figura 7: Taxa de Crescimento específico (TCE). P = 0,0207.

A taxa de crescimento específico foi maior nos peixes do grupo controle (1,01g) do que no grupo alimentado com a ração medicada (0,7g). Já, o grupo alimentado com o imunostimulante apresentou TCE estatisticamente igual a ambos os grupos (0,98g) (Figura 7).

O consumo, apesar de significativo na análise de variância, não apresentou diferença entre médias com o teste de Tukey (Figura 8).

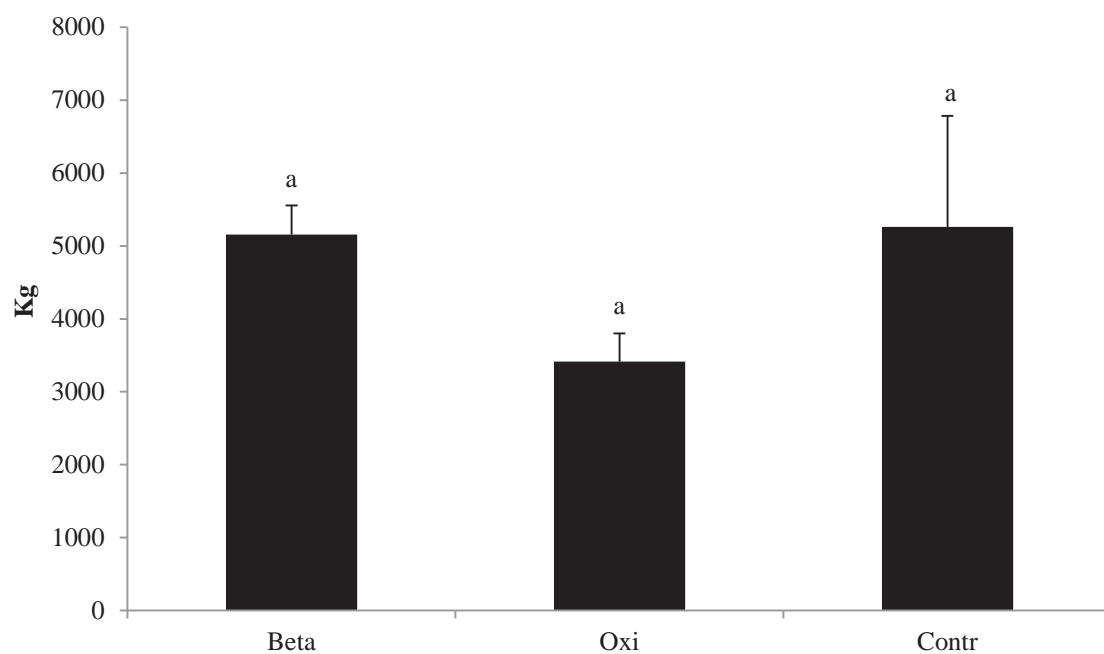


Figura 8: Consumo total de alimento. P = 0,0361.

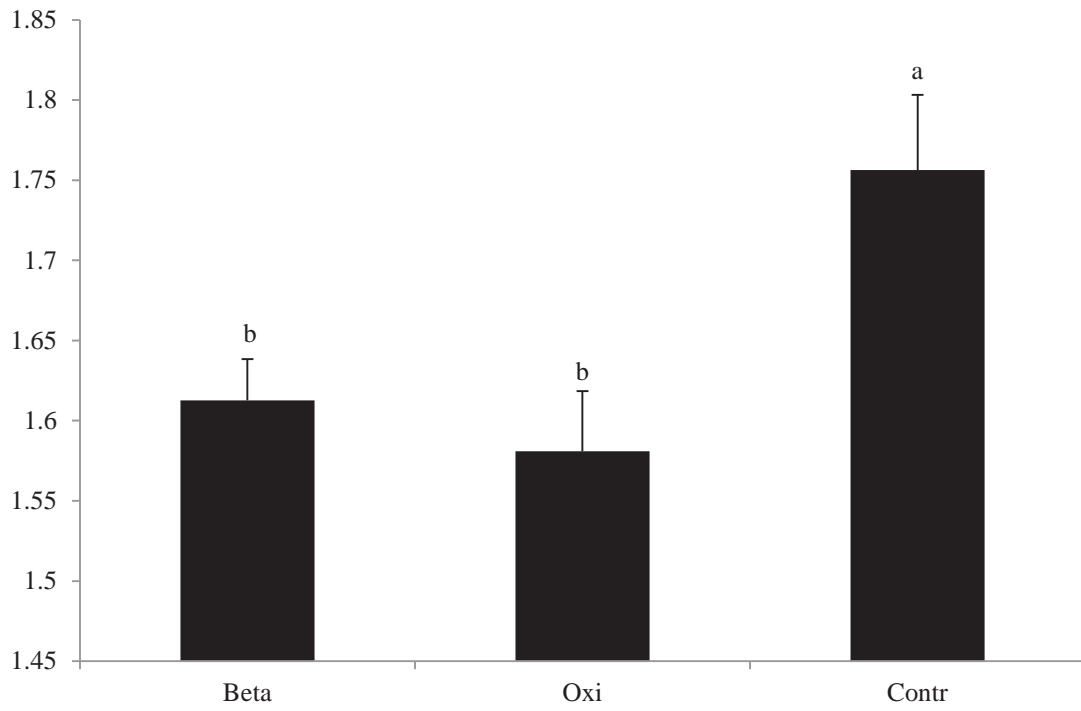


Figura 9: Conversão alimentar (CA). P = 0,0004.

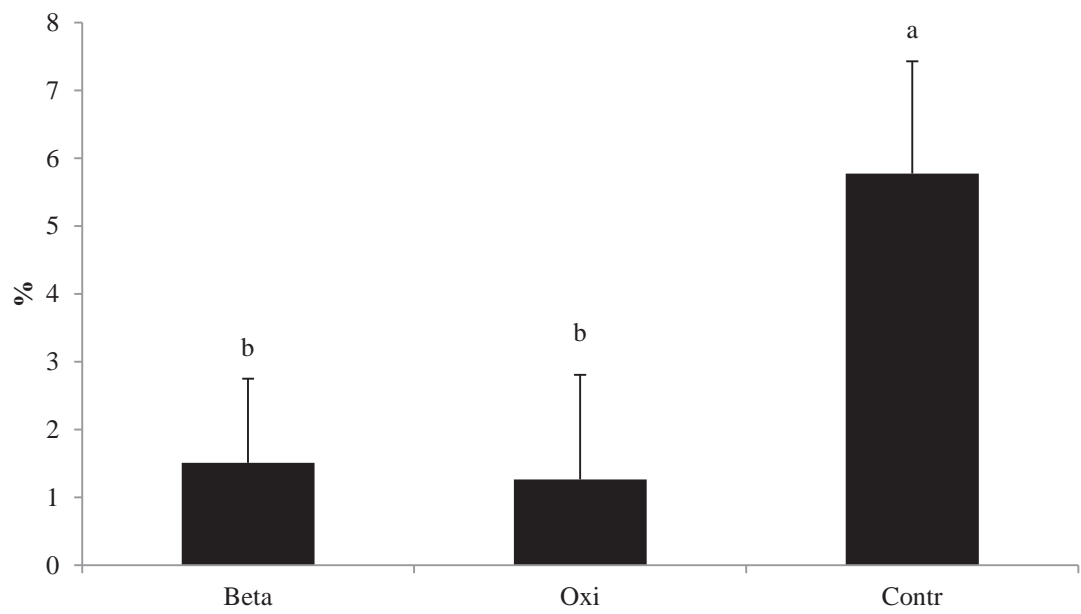


Figura 10: Mortalidade relativa aparente. P = 0,0045.

A conversão alimentar (Figura 9) dos peixes alimentados com a dieta acrescida de β -glucano (1,60) e oxitetraciclina (1,57) não diferiram estatisticamente entre si, e ambas foram melhores que a do grupo controle (1,75).

A mortalidade aparente (Figura 10) nos peixes alimentados com a dieta controle foi mais elevada (5,76%) que nos grupos alimentados com a ração contendo β -glucano (1,5%) ou oxitetraciclina (1,28%).

Hematologia

Os índices hematológicos não apresentaram diferença em relação aos tratamentos experimentais, porém estão de acordo com os índices determinados para tilápias saudáveis segundo Tavares-Dias (2004). As diferenças estatísticas para o hematócrito e hemoglobina estão relacionadas aos dias de coleta (Tabela 5).

Bioquímica sanguínea e cortisol

Assim como os valores médios das variáveis hematológicas, a glicose e as proteínas plasmáticas totais não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, apenas entre coletas. Em relação à glicose, um dos principais indicadores de estresse, pode-se observar valores mais elevados na primeira colheita sanguínea (dia 0) devido ao manejo estressante (classificação) realizado no dia anterior. Porém, os valores de cortisol não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ou coletas (Tabela 6).

Tabela 5: Variáveis hematológicas de série vermelha. Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina; RBC: contagem de células vermelhas; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. Não houve diferença em relação aos tratamentos. Letras diferentes nas linhas significam diferença estatística entre os dias de coleta (Tukey).

		Dia 0	7 dias	14 dias	28 dias
Ht %	<i>β-glucano</i>	41,2 ^a	35,8 ^b	37,6 ^b	37,6 ^b
	<i>Oxitetraciclina</i>	38,8 ^a	36,7 ^b	36,9 ^b	36,6 ^b
	<i>Controle</i>	39,9 ^a	35,8 ^b	36,4 ^b	35,6 ^b
Hb g.dL ⁻¹	<i>β-glucano</i>	8,86 ^a	8,38 ^{ab}	7,79 ^b	8,06 ^{ab}
	<i>Oxitetraciclina</i>	8,96 ^a	8,43 ^{ab}	7,49 ^b	7,65 ^{ab}
	<i>Controle</i>	8,46 ^a	7,73 ^{ab}	7,5 ^b	8,08 ^{ab}
RBC 10 ⁶	<i>β-glucano</i>	2,7	2,22	2,19	2,17
	<i>Oxitetraciclina</i>	2,25	2,28	2,07	2,13
	<i>Controle</i>	2,09	2,13	2,05	2,05
VCM fL	<i>β-glucano</i>	168	163,3	178,4	174,2
	<i>Oxitetraciclina</i>	181,4	163,9	178,3	172
	<i>Controle</i>	191	172,2	179,3	162,3
CHCM g.dL ⁻¹	<i>β-glucano</i>	21,1	23,8	20,9	22,1
	<i>Oxitetraciclina</i>	23,4	23,2	21	21,1
	<i>Controle</i>	21,6	21,7	20,7	23,3

Tabela 6: Bioquímica sanguínea e cortisol sérico. PPT: proteína total plasmática. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças significativas (Tukey). *Valores não obtidos.

		Dia 0	7 Dias	14 dias	28 dias
Glicose mg.dL ⁻¹	<i>β-glucano</i>	82 ^a	41,2 ^b	45,5 ^b	39,9 ^b
	<i>Oxitetraciclina</i>	79,8 ^a	43,8 ^b	48,4 ^b	36,8 ^b
	<i>Controle</i>	77,3 ^a	49,9 ^b	41,4 ^b	39,1 ^b
PPT ml.dL ⁻¹	<i>β-glucano</i>	3,8 ^b	4,6 ^a	4 ^{ab}	4,1 ^b
	<i>Oxitetraciclina</i>	3,8 ^b	4,1 ^a	3,9 ^{ab}	3,8 ^b
	<i>Controle</i>	3,4 ^b	4,3 ^a	3,8 ^{ab}	3,8 ^b
Cortisol μg.dL ⁻¹	<i>β-glucano</i>	9,08 ^a	10,07 ^a	9,09 ^a	*
	<i>Oxitetraciclina</i>	9,77 ^a	13,47 ^a	9,81 ^a	*
	<i>Controle</i>	8,01 ^a	10,51 ^a	9,68 ^a	*

Tabela 7: Burst: atividade respiratória de leucócitos. D.O.: Densidade óptica a 540nm. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças significativas (Tukey).

		Dia 0	7 Dias	14 dias	28 dias
Burst D.O.	<i>β-glucano</i>	0,367 ^a	0,4 ^a	0,546 ^a	0,476 ^a
	<i>Oxitetraciclina</i>	0,328 ^a	0,361 ^a	0,487 ^a	0,448 ^a
	<i>Controle</i>	0,388 ^{ab}	0,332 ^b	0,548 ^a	0,490 ^{ab}

Atividade respiratória de leucócitos

A atividade respiratória de leucócitos não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, mas sim entre os dias de coleta, provavelmente devido ao manejo estressante de classificação realizado antes do início do experimento (dia 0) (Tabela 7).

d. Discussão

A utilização da oxitetraciclina na dieta de animais de criação, visando aumentar o ganho de peso já foi descrita em várias espécies como frangos (Dibner & Richard, 2005), suínos (Tsinas et al., 1998) e peixes (Mitra & Gosh, 1967; Sukhoverkhov, 1967; em Rijkers et al., 1980). Rijkers et al. (1980), alimentando carpa comum com 2000 ppm do antimicrobiano (0,2%), observaram uma melhora no desempenho dos animais, tendo como explicação a alteração da microbiota intestinal, com a redução da quantidade e da diversidade, bem como o potencial das bactérias aderirem ao epitélio entérico e, conseqüentemente, diminuindo a competição entre o hospedeiro e os microrganismos por nutrientes (Bakke-McKellep et al., 2007).

Neste trabalho, foi observada uma diminuição do ganho de peso médio dos peixes alimentados com a ração medicada com 0,83% de oxitetraciclina, quando comparados aos peixes alimentados com a dieta acrescida de β -glucano ou com a dieta controle. Uma redução no ganho de peso dos peixes foi observada também por Rijkers

et al. (1980) ao injetarem intracelomaticamente oxitetraciclina na concentração de 60 e 180 mg.kg⁻¹ de peso vivo. A dose utilizada no experimento, de 0,83% de oxitetraciclina por quilo de dieta, foi de aproximadamente 250 mg.kg⁻¹ de peso vivo de peixe, muito acima da dose considerada elevada por estes autores e também por Noga (2010). O comitê veterinário europeu para produtos medicinais (CVMP), partindo da ingestão diária aceitável, estabelece a ingestão de tetraciclinas, com um fator de segurança de 10 em 0,003 mg.kg⁻¹ (EMEA, 1995).

Esta diminuição no ganho de peso, dos peixes alimentados com a ração medicada, também pode ser explicada pelas reações adversas relacionadas ao uso das tetraciclinas em animais, principalmente pela dose elevada utilizada no experimento, como efeitos locais (gastrointestinais), por superinfecção (disbiose), ação tóxica direta (hepatotoxicidade com degeneração gordurosa aguda, nefrotoxicidade e alterações ósseas) e ainda hipersensibilidade, refletindo negativamente sobre a saúde e o desempenho animal.

A conversão alimentar dos peixes alimentados com a ração medicada e dos peixes alimentados com a ração contendo β-glucano, foi melhor que a do grupo controle. Mesmo sem diferença significativa entre o consumo de cada grupo experimental, a queda na conversão alimentar, juntamente com a diminuição no ganho de peso médio, mostraram que a oxitetraciclina pode ter diminuído a palatabilidade da dieta, o que normalmente ocorre quando se adiciona fármacos na alimentação animal (Toften & Jobling, 1997).

Como dito anteriormente, a alteração na microbiota intestinal dos peixes alimentados com a ração medicada com a oxitetraciclina pode diminuir a competição entre o hospedeiro e as bactérias por nutrientes. Porém, a excessiva eliminação de microrganismos, pela alta dose do antimicrobiano utilizada neste experimento, pode ter

afetado a digestão e a absorção de nutrientes, causando uma diminuição da digestibilidade da ração.

Ainda é controverso o efeito do β -glucano no desempenho produtivo de peixes, sendo encontrados por diversos autores, resultados positivos, negativos e indiferentes em uma grande variedade de espécies de peixes. Ai et al. (2007), alimentando *Pseudosciaena crocea* com 0,09 e 0,18% de β -glucano, durante oito semanas, observou aumento na taxa de crescimento específico dos peixes alimentados com a dieta contendo 0,09% do imunostimulante em relação aos alimentados com 0,18% e ao grupo controle, assim como Misra et al. (2006), alimentando *Labeo rohita* com 100, 250 e 500 mg.kg⁻¹ do imunostimulante, por 56 dias. Contudo, Cook et al. (2003) encontraram um aumento considerável no ganho de peso de *Pagrus auratus* alimentados com 0,1% de β -glucano durante o inverno (12°), não observando esse incremento de ganho de peso durante o verão (24°). Whittington et al. (2005), além de não terem encontrado aumento do ganho de peso em tilápias-do-nilo alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de β -glucano, observaram uma diminuição na eficiência alimentar dos peixes que receberam 0,1 e 0,2% do imunostimulante. Li et al. (2009), trabalharam com híbridos de *Morone* spp. alimentados com dietas inclusas com o imunostimulante e não encontraram diferença significativa em nenhum parâmetro produtivo.

A mortalidade constatada nos grupos alimentados com a ração medicada com o antimicrobiano ou com o imunostimulante não diferiu, porém, em ambos os grupos ela foi quatro vezes menor que a mortalidade observada no grupo alimentado com a dieta controle. O efeito da oxitetraciclina como agente antibacteriano pode ser observado na redução da taxa de mortalidade, mesmo com seus possíveis efeitos tóxicos. Todavia, mesmo com vários pesquisadores ressaltando o efeito antimicrobiano da oxitetraciclina frente a microrganismos gram positivos e negativos, espécies aeróbias e anaeróbias

(Austin & Austin, 1987; Alderman, 1988; Herman et al., 1986), é importante salientar que o uso inadequado deste antimicrobiano, com regime de dosificação extrapolando as recomendadas por órgãos competentes, pode causar riscos potenciais pelos resíduos deste fármaco nos peixes destinados ao consumo humano e induzir resistência à oxitetraciclina nas bactérias, além do impacto negativo no meio aquático, ocasionando futuramente, sua retirada do mercado.

Uma série de trabalhos descreve o aumento da sobrevivência de várias espécies de peixes alimentados com β -glucano, em níveis próximos aos testados neste experimento (0,1%) após desafiados com cepas bacterianas e protozoários (Miles et al., 2001; Gopalakanan & Arul, 2010; Misra et al., 2006a; Li et al., 2009; Ai et al. 2007). Em peixes, os mecanismos pelos quais o β -glucano interage com as células do hospedeiro ainda não foram completamente elucidados. Segundo Medzhitov (2007), com o passar dos anos, os organismos pluricelulares aprenderam a reconhecer o β -glucano como um PAMP (Pathogen Molecular Pattern), através de PRRs (Pathogen recognition receptors), sendo a dectina-1 o receptor de maior importância. A ligação deste polímero com a dectina-1 pode desencadear uma série de processos imunológicos em mamíferos, como maturação das células dendríticas, endocitose ou fagocitose do ligante, aumento da atividade respiratória de leucócitos, produção de metabólitos do ácido aracônico e de citocinas e quimiocinas, como TNF (fator de necrose tumoral), CXCL-2 (proteína de macrófagos inflamatória-2- α), IL-23 (Interleucina-23), IL-6 e IL-10 (Brown et al, 2006).

Apesar do exposto, não foram encontradas diferenças significativas entre os peixes alimentados com ração medicada, com β -glucano e controle com relação a atividade respiratória de leucócitos, não sendo possível esclarecer a ausência de

diferença já que vários trabalhos relataram um aumento desta atividade em animais alimentados com o imunoestimulante.

No presente estudo não foi encontrada relação entre os níveis de cortisol sérico e tratamentos. Os valores encontrados estiveram entre 8 e 13,5 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, superior a 3 - 4 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ que Wedemeyer et al. (1990) utilizam para caracterizar um peixe em descanso ou em situação de conforto. Isso possivelmente ocorreu devido o experimento ser realizado em uma piscicultura comercial, com tilápias confinadas e muito adensadas (aproximadamente 320 indivíduos por metro cúbico de água). Outra hipótese é que todo o plantel era formado apenas por indivíduos machos, o que aumenta o estresse, como demonstrado por Binuramesh et al. (2006).

Ao contrário do observado neste estudo, Cain et al. (2003), fornecendo para a tilápia-do-nylo, ração com 0,2% de β -glucano, constataram uma diminuição nos níveis de cortisol sérico e glicose após três semanas de alimentação com a dieta experimental quando comparado aos peixes alimentados com a dieta controle. Jeney et al. (1997), detectaram alterações nos valores de cortisol de trutas arco-íris alimentadas com dieta contendo β -glucano. O valor mais baixo de cortisol foi observado nos peixes cuja dieta teve a inclusão de 0,1% e, com o aumento da inclusão, puderam observar que os valores eram próximos do grupo alimentado com a ração controle, isto é, sem a inclusão do imunoestimulante.

Uma possível inibição da resposta imune, dos peixes pelo estresse do ambiente de criação, talvez fosse uma explicação plausível para a inconsistência dos resultados obtidos nos valores da atividade respiratória de leucócitos, porém, o fato da sobrevivência dos peixes alimentados a ração contendo β -glucano ser igual a dos alimentados com a ração medicada com oxitetraciclina deixa claro que, mesmo com níveis elevados de cortisol, os animais estavam imunoestimulados. Outra hipótese é que

o imunoestimulante possa ter influenciado outros parâmetros imunológicos, como a atividade da lisozima, complemento, fagocitose, entre outros, e não a atividade respiratória de leucócitos.

Segundo Rebar et al. (2003), os parâmetros hematológicos fornecem uma visão instantânea do sistema hematopoiético em um momento específico e oferecem uma visão geral sobre o estado de saúde do animal.

Omoregie & Oyebanji (2002) encontraram variações em diversos parâmetros hematológicos de tilápias-do-nilo alimentadas com diferentes níveis de oxitetraciclina (0; 0,63; 1,25; 2,5 e 5 %) durante oito semanas. A alimentação com 1,25% (concentração relativa mais próxima à deste experimento), durante uma semana foi suficiente para acarretar uma diminuição na quantidade de eritrócitos, no valor do hematócrito e da hemoglobina, diferente do que ocorreu neste estudo, onde não foram constatadas diferenças entre os três grupos experimentais, mais sim, entre os dias de coleta e, somente no valor do hematócrito e da hemoglobina. Provavelmente, não foram observadas diferenças pelos valores terem variado consideravelmente. As médias do hematócrito (37,5%), volume corpuscular médio (163,7 fL) e concentração de hemoglobina corpuscular média (22 g.dL⁻¹) também foram diferentes das encontradas por Tavares-Dias & Faustino (1998) (30,4 %; 126,5 fL e 30,8 g.dL⁻¹, respectivamente) para tilápia-do-nilo. Tanto o hematócrito quanto a concentração de hemoglobina corpuscular média variaram devido ao aumento do VCM. Em situações de estresse são liberadas catecolaminas e, em especial a adrenalina, que causa a tumefação dos eritrócitos (Nikinmaa & Huestis, 1984), através da retenção de sódio e cloreto intracelular, aumentando sua concentração, gerando ganho de líquido por osmose e, conseqüentemente, um aumento do volume eritrocitário (Railo et al., 1985).

e. Conclusão

A incorporação de 0,1% de β -glucano na dieta de tilápia-do-nilo, criada em tanque-rede e em alta densidade de estocagem e administrado por 14 dias foi eficiente, pois melhorou o desempenho produtivo dos peixes e contribuiu para a redução na taxa de mortalidade durante o ciclo produtivo. A alimentação de tilápia-do-nilo, criada em tanque-rede e em alta densidade de estocagem, com ração medicada com 0,83% de oxitetraciclina e administrada por sete dias não é recomendada, pois apesar do antimicrobiano ter reduzido a taxa de mortalidade dos peixes, ele reduziu também o crescimento.

f. Agradecimentos

Nossos agradecimentos vão para a FAPESP, pelo apoio financeiro, para a FRI-RIBE pela grande quantidade de ração doada, para a Biorigin pela doação do MacroGard®, e para a Toca da Tilápia pela disponibilização de peixes e infraestrutura.

g. Referências

- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG L.; TAN B.; ZHANG W.; XU, W.; LI, H. 2007. Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 394-402
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. 1995. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff M., Arthur J.R., Subasinghe R.P. (Editors) *Diseases in Asian Aquaculture II*. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 185-202.

- BAKKE-MCKELLEPA, .N.; PENN, M.H.; SALAS, P.M.; REFSTIE. S.; SPERSTAD, S.; LANDSVERK, T.; RINGØ, R.; KROGDAH, B.Å. 2007. Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 97, 699-713.
- BILLER, J.D. 2008. Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila*, em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano. Dissertação (Mestre em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 106p.
- BINURAMESH, C.; PRABAKARAN, M.; STEIHAGEN, D.; MICHAEL, R.D. 2006. Effect of sex ratio on the immune system of *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Brain, Behavior and Immunity*, 20, 300-308.
- BROWN G.D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews in Immunology*, 6, 33-43.
- CAIN, K.D.; GRABOWSKI, L.; REILLY, J.; LYTWYN, M. 2003. Immunomodulatory effects of a bacterial-derived β-1,3 glucan administered to tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in a Spirulina-based diet. *Aquaculture Research*, 34, 1241-1244.
- COLLIER, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, 50, 550-552.
- COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish & Shellfish Immunology*, 14, 333-345.

- DIBNER, J. J & RICHARDS J. D. 2005. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. *Poultry Science*, 84, 634–643.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E.1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56, 35-39.
- GOPALAKANNAN, A & ARUL, V. 2010. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. *Aquaculture Research*, 41(6), 884-892.
- HRUBE, T.C.; SMITH, S.A. 1998. Hematology of fish. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5, 1120-1125.
- JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154(1), 1-15.
- LEVY, S.B.; MARSHALL, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10, 122–129.
- LI, P.; WEN, Q.; GATLIN III, D.M. 2009. Dose-dependent influences of dietary β -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*. *Aquaculture Research*, 40, 1578-1584.
- MEDZHITOV, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 819-826.
- MILES, D. J. C.; POLCHANA, J.; LILLEY, J. H.; KANCHANAKHAN, S.; THOMPSON K.D.; ADAMS, A. 2001. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, 195(1-2), 1-15.

- MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PATTNAIK, P. 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255(1).
- MITRA, R & GHOSH, S.C. 1967. The effect of Terramycine on the growth of some freshwater food fishes: (*Labeo rohita*, *Catla catla* and *Cirrhina mtigala*) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, India, 37, 406–408 Sect. B. (Biol. Sci.)
- NIKINMAA, M & HUESTIS, W.H. 1984. Adrenergic swelling of nucleated erythrocytes: cellular mechanism in a bird, domestic goose, and two teleost, striped bass and rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 113, 215-224.
- NOGA E.J. 2010. Fish Disease: Diagnoses and treatment. Second edition. Wiley-Blackwell. 382-383.
- OMOREGIE, E.E & OYEBANJI, S.M. 2002. Oxytetracycline-induced blood disorder in juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Journal of the World Aquaculture Society*, 33, 389-394.
- RAILO, E.; NIKINMAA, M., SOIVO, A. 1985. Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gaudneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 26, 725-732.
- RIJKERS, G.T.; TEUNISSEN, A.G.; VAN OOSTEROM, R.; VAN MUISWINKEL, W.B. 1980a. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 19, 177-189. In: Rijkers G.T.; Van Oosterom R.; Van Muiswinkel W.B. 1981. The immune system of cyprinid fish, oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2, 281-290.

- SUKHOVERKHOV, F.M. 1967. The effect of cobalt, vitamins, tissue preparations and antibiotics on carp production. FAO Fisheries Report. *Proceedings of the FAO World Symposium on Warm-water Pond Fish Culture*, 401–407. In: Rijkers, G.T.; Frederix-Wolters, E.M.H.; Van Muiswinkel, W. B. 1980. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology*, 41-91.
- TAVARES-DIAS M., FAUSTINO C.D. 1998. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. *Ars Veterinaria*, 14(3), 254-263.
- TAVARES-DIAS M., MORAES F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto, São Paulo: Villimpress, v.1, 144 p.
- TOFTEN, H.; JOBLING, M. 1997. Feed intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed diets supplemented with oxytetracycline and squid extract. *Aquaculture Nutrition*, 3, 145-151.
- TSINAS, A. C.; KYRIAKIS, S. C.; LEIWAS, S.; SARRIS, K.; BOURTZT-HATZOPOULOU, E.; SAOULIDI, K. 1998. Control of Proliferative Enteropathy in Growing/Fattening Pigs Using Growth Promoters. *Journal of Veterinary Medicine*, 45, 115-127.
- WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.A.; MCLEAY, D.J. 1990. Stress and acclimation. In: Schreck C.B.; Moyle P.B. (Editors). *Methods for Fish biology*. American Fisheries Society, 451-489.
- WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIUS, P.H. 2005. Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 248, 217–225.

WINTROBE, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51, 32–49.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Em: Silbergeld E.K., Graham J., B. Price L.B. (2008). Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. *Annual Reviews in Public Health*. 29,151–69.

**4. Experimento II: COMPARAÇÃO DA INCLUSÃO DE B-GLUCANO E
MANANOLIGOSSACARÍDEO NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIAS-DO-
NILO COM A UTILIZAÇÃO DE OXITETRACICLINA**

a. Introdução

A aquicultura mundial tem apresentado um grande crescimento e, junto com a produção, crescem também o número e a intensidade de situações de estresse, assim como o aparecimento de enfermidades (Staykov et al., 2007) e a utilização de drogas.

O uso de fármacos na aquicultura é um fato comprovado quanto a necessidade de tratamento de certas enfermidades, mas para a maioria das espécies de peixes existe uma falha de conhecimento da farmacocinética destes fármacos, que leva na maioria das vezes, ao uso de doses prescritas para outras espécies animais com graves riscos farmacológicos e toxicológicos (Anadón, 2012).

A Organização Mundial de Saúde classificou o surgimento de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos, como uma grave ameaça à saúde pública (WHO, 2006) e a severidade legal com relação ao uso de quimioterápicos e antimicrobianos na aquicultura vem aumentando drasticamente nos últimos anos. Mais recentemente, o foco tem sido direcionado para a utilização de ingredientes, conhecidos como prebiótico, probióticos e imunostimulantes que desenvolvam a capacidade de resistir a doenças e melhorar a saúde dos peixes em criações comerciais, altamente estressantes. Entre esses ingredientes, destacam-se o β -glucano e o mananoligossacarídeo, os quais vêm se tornando uma alternativa promissora ao uso de agentes antimicrobianos.

O β -glucano, derivado da parede celular de levedura, tem como via de ação a modulação da resposta imune inata, (Sahoo & Mukherjee, 2001; Couso et al., 2003; Whittington et al., 2005; Misra et al., 2006; Ai et al., 2007; Gopalakanan & Arul, 2009; Li et al., 2009; Khuntu et al., 2009). O mananoligossacarídeo, composto naturalmente presente na parede celular de leveduras, tem a capacidade de modular respostas imunológica (He et al., 2003; Staykov, 2007; Torrecillas et al., 2007; Rodriguez-Estrada

et al., 2008; Samrongpan et al., 2008; Andrews et al., 2009) e a microbiota intestinal (Dimitroglou et al., 2009; Torrecillas et al., 2011) e preservar a integridade da superfície de absorção intestinal, ao bloquear a aderência das bactérias patogênicas às células epiteliais da mucosa do intestino (Loddi, 2003).

Vários estudos demonstram a eficiência desses aditivos alimentares, porém, os resultados variam muito de acordo com a espécie, clima, ambiente de criação, nível do aditivo e grau de pureza do mesmo.

A oxitetraciclina é um agente antimicrobiano amplamente utilizado em diversas criações de animais, inclusive na piscicultura. Uma falha no conhecimento da dosificação deste fármaco para peixes leva, na maioria das vezes ao uso de doses prescritas para outras espécies animais, com riscos para toda a cadeia produtiva. No Brasil, este antimicrobiano é amplamente utilizado na piscicultura, na maioria das vezes de forma indiscriminada e sem critérios, inclusive com relação ao modo de aplicação, que na maioria das vezes resulta em doses sub-terapêuticas ou demasiadamente elevadas, causando impacto ambiental e danos a saúde dos animais e consumidores (Li et al., 2009).

O presente estudo teve como objetivo comparar a inclusão de mananoligossacarídeo, β -glucano e oxitetraciclina, separadamente, na alimentação de juvenis de tilápia-do-nilo, avaliando os efeitos sobre os parâmetros de imunidade inata, hematológicos e sobrevivência.

b. Material e Métodos

Peixes e alimentação

As pós-larvas de tilápia-do-nilo foram adquiridas de uma piscicultura comercial (Aracanguá, Auriflora, São Paulo, Brasil) com cerca de um grama cada. Os animais foram estocados em caixas de 310 L, com aeração e fluxo de água constante e, alimentados com dieta comercial para alevinos até alcançarem cerca de 45 gramas. Logo após foram distribuídos em vinte caixas, com as mesmas dimensões do período de aclimação, cada uma contendo 30 alevinos, aeração e fluxo de água constante.

As rações experimentais, extrusadas, foram formuladas e produzidas pela indústria de rações Nutreco-Fri-Ribe (Tabela 5), Pitangueiras, São Paulo, Brasil, para tilápia em crescimento (32% PB), uma contendo 0,1% de β -glucano (MacroGard[®], Biorigin, Lençóis Paulistas, São Paulo, Brasil), outra contendo 0,1% de Mananligossacarídeo (ActiveMOS[®], Biorigin, Lençóis Paulistas, São Paulo, Brasil) e a terceira, contendo 0,83% de oxitetraciclina (Tm700[®], Phibro). Uma quarta dieta, isenta de aditivos, foi preparada seguindo a mesma formulação das anteriores e foi usada como controle.

Tabela 8. Níveis de garantia da formulação comercial utilizada no experimento

Níveis de Garantia (quantidade por kg de ração)			
Umidade**	120g	Colina*	800mg
Proteína Bruta (Mínimo)	320g	Ácido Fólico*	5,4mg
Extrato Etéreo*	60g	Niacina*	112,5mg
Matéria Mineral**	110g	Biotina*	0,58mg
Matéria Fibrosa**	70g	Ácido Pantotênico*	36mg
Cálcio	10 - 30g	Vit A*	9000U.I.
Fósforo*	6000mg	Vit B1*	20,25mg
Magnésio*	31,25mg	Vit B12*	22,5µg
Zinco*	100mg	Vit B2*	20,25mg
Cobre*	25mg	Vit B6*	20,25mg
Ferro*	62,5mg	Vit C*	300mg
Manganês*	62,5mg	Vit D3*	3150U.I.
Cobalto*	0,6mg	Vit E*	135U.I.
Iodo*	1,25mg	Vit K3*	9mg
Selênio*	0,25mg	Inositol*	80,g

*Mínimo. **Máximo

Tabela 9. Composição química do MacroGard® segundo o fabricante

Ingrediente	Quantidade
*β-glucanas %	Mín. 60,0
*Proteína Bruta %	Máx. 8,0
*pH (solução 10%)	4,0 - 7,0
*Cinzas %	<10,0
Distribuição do tamanho de partícula	
Média	41 µm
<20 µm	19%
20 - 50 µm	43%
51 - 100 µm	28%
101 - 200 µm	10%
>200 µm	0
Fluidez (seg)	70
Ângulo de repouso (graus)	31
Compressibilidade %	37
Capacidade de retenção de água (média)	7,4
Índice de solubilidade em água	7,9

Tabela 10. Composição química do ActiveMos® segundo o fabricante

Ingrediente	%
Proteína bruta (máx)	30
Umidade (máx)	8,0
Fibra bruta (máx)	3,0
Cinzas (máx)	6,0
Carboidratos	5,5
Mananoligossacarídeo	25 ± 3,0
β-glucano	30 ± 3,0

As caixas foram divididas durante a alimentação com as dietas experimentais, totalizando cinco caixas por tratamento. Todos os animais foram alimentados com base em 3% do peso vivo das caixas duas vezes ao dia. Tanto os animais do grupo que receberam MOS quanto os do grupo que receberam β-glucano foram alimentados durante 14 dias com as dietas experimentais. Os peixes alimentados com a ração medicada com oxitetraciclina foram alimentados durante sete dias. A dieta isenta de aditivo e antimicrobiano foi fornecida ao grupo controle durante todo o período experimental e, para todos os outros grupos após o término do período de alimentação com as dietas experimentais.

A qualidade de água foi controlada durante todo o período experimental, com os principais parâmetros aferidos a cada dois dias. Não foram encontradas alterações significativas em nenhum dos parâmetros: temperatura (29,53°C), oxigênio dissolvido (5,02 mg/L⁻¹), condutividade (0,185 mS.cm⁻¹), sólidos totais (121,33 mg.L⁻¹), salinidade (0,09 ppt), pH (7,22), NH₄ (0,012 mg.L⁻¹) e NH₃ (0 mg.L⁻¹).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de Jaboticabal, sob o protocolo de

número 22.517/10, estando de acordo com os Princípios Éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Amostragens

Foram realizadas duas amostragens, a primeira antes do início da alimentação com as dietas experimentais e a segunda logo após o término. Seis peixes de cada caixa foram anestesiados em solução de benzocaína (1 g de benzocaína para 10 L de água) e tiveram cerca de 1 mL de sangue periférico colhido por punção do vaso caudal. O sangue de dois peixes era armazenado em tubos plásticos de 2 mL contendo 15 µL de heparina (1:50). O restante do sangue era colocado em tubos de vidro (um para cada animal), permanecendo por 45 minutos, em temperatura ambiente para coagulação. Após o período de coagulação, o sangue era centrifugado (1500g por 5 minutos), e o soro armazenado em ultrafreezer (-70 °C). Nenhum animal amostrado era devolvido as caixas experimentais, permanecendo em caixas separadas.

Hematologia

O hematócrito foi realizado seguindo a metodologia do microhematócrito (Goldenfarb et al., 1971).). A determinação da quantidade de hemoglobina presente no sangue foi realizada através do método da cianometahemoglobina (Collier, 1944). As extensões sanguíneas foram coradas com MG-G-W (May-Grünwald-Gyemsa-Writh) para posterior contagem total e diferencial de trombócitos e leucócitos (Hrube & Smith, 1998). Foram utilizadas as equações hematimétricas de acordo com Wintrobe (1934) para a determinação do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Resposta imune inata

O ensaio de atividade respiratória de leucócitos foi realizado de acordo com Anderson & Siwichi (1995), modificado por Biller-Takahashi (2008). Cem microlitros de sangue contendo anticoagulante foram adicionados em cem microlitros de tampão fosfato (pH 8.4) contendo nitroazul de tetrazolium (NBT). Após incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, 50 μL desta solução foi adicionada a 1mL de N,N-dimetilformamida, agitado, centrifugado a 450rpm por 5 minutos e então lido em espectrofotômetro (540 nm, absorvância).

A concentração de lisozima sérica foi determinada de acordo com Ellis (1990), modificada por Abreu et al. (2009), em ensaio turbidimétrico, onde a densidade óptica de uma solução de *Micrococcus lysodeikticus* declina pela lise da parede celular. Cem microlitros contendo 50 μL de soro de tilápia-do-nilo e 50 μL de solução tampão (pH 7,4) foram adicionados a 100 μL de solução contendo 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de *Micrococcus lysodeikticus* e dispensados em placas de 96 poços. A densidade óptica foi mensurada em leitor de ELISA (540nm) no início da reação e após 5 e 10 minutos.

Desafio bacteriano

A cepa de *Streptococcus agalactiae*, isolada de tilápia-do-nilo (amostra 100, LAPOA, Jaboticabal SP) foi previamente identificada através de sequenciamento do gene 16 S rDNA, estocada em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, Himedia) com 30% de glicerol 100%, estéril, em freezer -20°C . Uma alíquota de 20 μl da cepa estoque foi inoculada em 5 ml de meio BHI, autoclavada e, incubada em estufa bacteriológica a 30°C , por 48h, para formação do pré-inóculo. Em seguida, adicionou-se o volume total do pré-inóculo a 600 ml de meio BHI, autoclavado, e incubou-se novamente a 30°C por mais 48h. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 1000 rpm por 10min, descartando-

se o sobrenadante (meio de cultura) e obtendo-se os pellets da bactéria. Para lavagem dos pellets, adicionou-se a estes uma solução de PBS (0,1M), volume suficiente para homogeneizar a solução e, em seguida, procedeu-se a centrifugação por mais 10 min a 1000 rpm. Esta operação foi repetida duas vezes. A partir dos pellets lavados, foi feita diluição da bactéria a concentração de 10^6 (determinada anteriormente pelo teste de CL50), de acordo com a Escala de MacFarland. Um volume de 0,5 ml da diluição bacteriana descrita foi injetado intracelomaticamente nos peixes já após a alimentação com as dietas experimentais, em três caixas por tratamento. Nas duas restantes, foi injetado 0,5 ml de PBS em cada peixe.

c. Resultados

Parâmetros de imunidade inata

As análises imunológicas não mostraram diferença significativa em relação aos tratamentos, mas sim entre os dias de amostragem (Tabela 11).

Tabela 11: Valor da atividade respiratória de leucócitos (burst oxidativo) e lisozima de tilápia-do-nilo alimentadas com rações contendo β -glucano, mananoligossacarídeo, oxitetraciclina e ração controle.

		Antes	Após
Burst oxidativo O.D.	<i>Controle</i>	0,359	0,400
	<i>Oxi</i>	0,353	0,416
	<i>Beta</i>	0,344	0,431
	<i>MOS</i>	0,313	0,405
Lisozima $\eta\text{g.mL}^{-1}$	<i>Controle</i>	0,412	0,298
	<i>Oxi</i>	0,388	0,361
	<i>Beta</i>	0,477	0,346
	<i>MOS</i>	0,543	0,306

Oxi = oxitetraciclina; *Beta* = β -glucano; *MOS* = mananoligossacarídeo

Hematologia

Não foi possível observar diferenças significativas nos parâmetros de série vermelha em relação aos tratamentos fornecidos, mas sim em relação aos dias de tratamentos.

Tabela 12: Variáveis hematológicas de série vermelha. HB: Hemoglobina; Ht: Hematócrito; RBC: Quantidade de células vermelhas; VCM: Volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

		Antes	Após
HB g.dL ⁻¹	<i>Controle</i>	4,48	5,98
	<i>Oxi</i>	5,16	5,91
	<i>Beta</i>	5,29	6,06
	<i>MOS</i>	4,80	5,71
Ht %	<i>Controle</i>	27,3	35,1
	<i>Oxi</i>	28,7	36,0
	<i>Beta</i>	28,3	32,2
	<i>MOS</i>	30,1	32,6
RBC 10 ⁶	<i>Controle</i>	1,66	2,30
	<i>Oxi</i>	1,87	2,36
	<i>Beta</i>	1,84	2,43
	<i>MOS</i>	1,97	1,97
VCM fL	<i>Controle</i>	167,53	160,72
	<i>Oxi</i>	157,07	162,57
	<i>Beta</i>	156,85	138,77
	<i>MOS</i>	155,47	169,34
CHCM g.dL ⁻¹	<i>Controle</i>	16,69	17,14
	<i>Oxi</i>	17,98	16,65
	<i>Beta</i>	18,95	19,24
	<i>MOS</i>	16,06	17,44

Oxi = oxitetraciclina; *Beta* = β -glucano; *MOS* = mananoligossacarídeo

Tabela 13: Parâmetros hematológicos de série branca. Tromb: Trombócitos; Leuc: Leucócitos; Mon: Monócitos; Linf: Linfócitos; Neut: Neutrófilos, Baso: Basófilos; Eos: Eosinófilos; L.I.:Linfócitos Imaturos.

		Antes	Após
Tromb 10 ³ células.µL ⁻¹	Controle	26,69	26,39
	Oxi	22,22	22,85
	Beta	26,17	28,29
	MOS	21,03	21,52
Leuc 10 ³ células.µL ⁻¹	Controle	87,83	126,83
	Oxi	109,12	112,22
	Beta	112,61	136,53
	MOS	116,42	96,69
Mon 10 ³ células.µL ⁻¹	Controle	6,08	7,93
	Oxi	7,67	6,88
	Beta	6,77	6,28
	MOS	13,13	5,47
Linf 10 ³ células.µL ⁻¹	Controle	74,51	133,53
	Oxi	90,82	134,99
	Beta	93,40	142,06
	MOS	89,17	95,17
Neut 10 ³ células.µL ⁻¹	Controle	2,88	7,30
	Oxi	3,99	8,17
	Beta	4,04	5,57
	MOS	5,54	5,94
Bas 10 ³ células.µL ⁻¹	Controle	0,20	1,32
	Oxi	0,39	0,34
	Beta	0,80	1,54
	MOS	0,16	0,78
Eos 10 ³ células.µL ⁻¹	Controle	0,00	0,07
	Oxi	0,00	0,15
	Beta	0,00	0,00
	MOS	0,00	0,52
L.I. 10 ³ células.µL ⁻¹	Controle	5,37	5,75
	Oxi	6,25	8,96
	Beta	7,66	4,85
	MOS	8,12	5,29

Desafio bacteriano

A mortalidade do grupo alimentado a ração contendo 0,83% de oxitetraciclina, ao final do período experimental foi de 3,7%, enquanto que a mortalidade nos grupos

alimentados com a ração contendo β -glucano e mananoligossacarídeo (MOS) foi de 59,1 e 44,4% respectivamente. A mortalidade no grupo controle foi de 50%, não sendo diferente estatisticamente dos grupos alimentados com as rações contendo os aditivos alimentares.

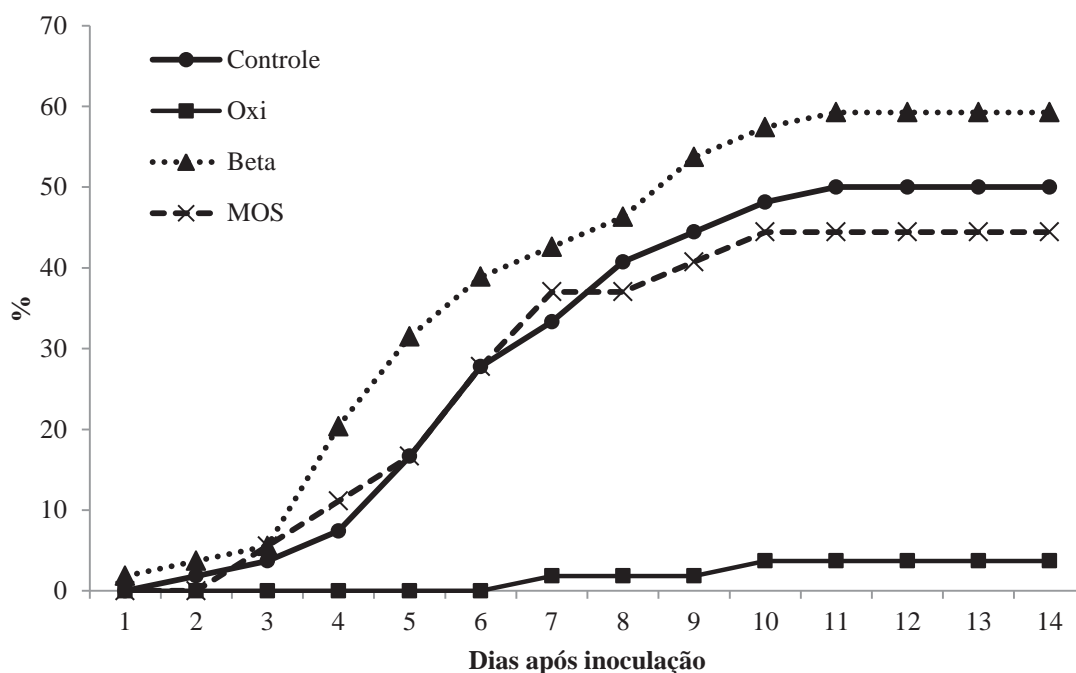


Figura 11: Mortalidade observada nos peixes dos diferentes grupos experimentais inoculados intracelomaticamente com 10^6 UFC de *Streptococcus agalactiae*.

A mortalidade nos peixes inoculados com a solução tampão (PBS) pode ser observada nos grupos alimentados com a ração controle e com a inclusão dos dois aditivos (mortalidade entre 12 e 17%), todavia não foram constatadas mortalidades nos peixes alimentados com a ração medicada com a oxitetraciclina.

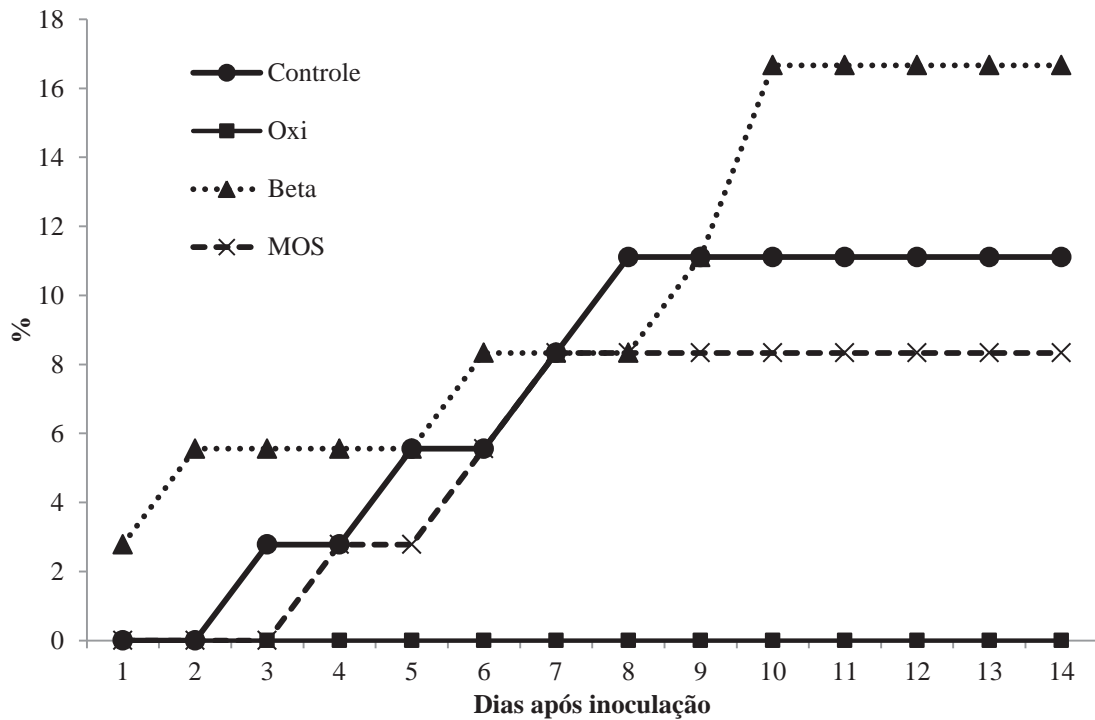


Figura 12: Mortalidade aparente observada nos peixes inoculados com solução de PBS.

d. Discussão

Apesar da taxa de mortalidade reduzida, já esperada, no grupo alimentado com a ração medicada com oxitetraciclina após a inoculação bacteriana, observamos uma curva de mortalidade muito semelhante nos grupos alimentados com a ração controle e com as rações contendo β -glucano e mananoligossacarídeo. Assim, como outros compostos do grupo das tetraciclina, a oxitetraciclina age inibindo a síntese de proteínas bacterianas interferindo na ligação do tRNA aminoacetilado ao sítio A da subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, consequentemente impedindo o aparecimento do complexo de iniciação de tradução (Spahn & Prescott, 1996).

Alguns trabalhos descreveram um aumento na sobrevivência de peixes alimentados com β -glucano após desafio bacteriano. Gopalakannan & Arul (2010),

alimentando carpa comum com uma dieta contendo 1% de β -glucano, por três semanas, relataram uma sobrevivência de 77,8 e 71,6% nos peixes desafiados com *Aeromonas hydrophila* aos 30 e 60 dias após o término da alimentação com a dieta experimental, enquanto que no grupo controle não foi observada sobrevivência. Misra et al. (2006) observaram que a inclusão de níveis menores de β -glucano, na dieta de *Laboe rohita* (0,001, 0,025 e 0,05%), alimentados durante 56 dias, proporcionaram maior sobrevivência dos peixes após inoculação de *Edwardsiella tarda* e *A. hydrophila* quando comparados com peixes do grupo controle. Whittington et al. (2005), utilizaram níveis menores de β -glucano (0, 0,005, 0,01 e 0,02%) que as do presente estudo para tilápia-do-nilo, durante 12 semanas e, observaram maior quantidade de lisozima sérica nos peixes que receberam o maior nível do aditivo, todavia, não encontraram redução na taxa de mortalidade, somente observaram redução desta taxa quando o imunoestimulante foi associado a vacinação contra *Streptococcus agalactiae*. Com níveis de inclusão de β -glucano semelhantes aos utilizados neste estudo (0,09 e 0,18%), Ai et al. (2007), alimentaram *Pseudosciaena crocea* durante oito semanas e observaram uma diminuição da mortalidade após o desafio com *Vibrio harveyi* apenas no grupo que recebeu a dieta contendo 0,09% do imunoestimulante.

Casos de insucesso com a utilização de β -glucano na alimentação de peixes também foram registrados. Bridle et al. (2005), testaram três diferentes marcas comerciais de β -glucano para salmão do atlântico e não obtiveram redução da mortalidade após o desafio com amebas (*Neoparamoeba* spp.). Zhou et al. (2010), trabalharam com a inclusão de 1% de MOS na dieta de *Sciaenops ocellatus* e observaram aumento na produção de lisozima nos peixes alimentados com a ração contendo MOS e uma diminuição da sobrevivência após oito semanas de alimentação.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), substâncias com potencial bactericida, é conhecida por atividade respiratória de leucócitos, e se apresenta como uma importante via de eliminação de patógenos por estas células (Secombes & Fletcher, 1992). Nenhum dos grupos apresentaram diferenças significativas na produção de EROs. O mesmo ocorreu com a quantidade de lisozima, uma importante enzima encontrada no sangue, muco e fluidos corporais, capaz de lisar a camada de peptidoglicanos na parede celular de bactérias (Secombes & Fletcher, 1992).

Tanto o β -glucano como o MOS são reconhecidos por receptores imunológicos capazes de modular a resposta imune inata, como a produção e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias e respostas celulares (Willment & Brown, 2007). Em peixes, estes receptores celulares ainda não foram descritos, porém, relatos da modulação da resposta imune já foram encontrados. Li et al. (2009), encontraram efeito dose-resposta na atividade respiratória de leucócitos em peixes alimentados com diferentes níveis de β -glucano, onde a maior dose (0,2%) produziu resultados próximos a do grupo alimentado com a dieta controle, diferindo do grupo alimentado com 0,05 e 0,1%. Ai et al. (2007), observaram aumento na produção de lisozima sérica concomitantemente ao aumento da quantidade de glucano na dieta.

Torrecillas et al. (2007), alimentaram *Dicentrarchus labrax* com dieta contendo MOS e puderam observar uma redução na produção de EROs nos peixes alimentados com 0,2% do prebiótico, seguido de um aumento deste parâmetro no grupo alimentado com 0,4%. Andrews et al. (2009), obtiveram resultados semelhantes trabalhando com *Labeo rohita* alimentados com rações contendo 1, 2 e 4% de MOS. Staykov et al. (2007), alimentaram trutas arco-íris mantidas em tanques rede com 0,2% de MOS durante 60 dias e detectaram um aumento nos níveis de lisozima sérica. Resultados similares foram encontrados por Zhou & Li (2004) e por Staykov et al. (2005). Zhou et

al. (2010), observaram maior quantidade de lisozima em *Sciaenops ocellatus* alimentados com 1% de MOS, mas nenhuma diferença foi notada com relação à taxa de respiração de leucócitos.

O perfil hematológico, dos juvenis de tilápia utilizados neste estudo não apresentou nenhuma alteração relacionada aos tratamentos. Welker et al. (2011), alimentaram bagres do canal, *Ictalurus punctatus* com níveis próximos ao deste estudo, tanto de MOS, quanto de β -glucano e também não observaram diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos. Welker et al. (2007), em experimento similar ao citado anteriormente, encontraram diferenças apenas no hematócrito, com aumento desta variável nos peixes alimentados com β -glucano. O mesmo foi observado por Sado et al. (2008), que forneceram níveis crescentes de MOS (0,2 à 1%) a juvenis de tilápia-do-nilo. Mansour et al. (2012), encontraram aumento no número de linfócitos em *Huso huso* alimentados com 0,2 e 0,4% de mananoligossacarídeo durante 46 dias.

Rodriguez-Estrada et al. (2008), alimentaram com 0,4% de inclusão de MOS carpa comum por 12 semanas e observaram um aumento na sobrevivência dos peixes desafiados com *Vibrio anguillarum*. O mesmo ocorreu com Somrongpam et al. (2008), ao fornecerem 0,2, 0,4 e 0,6% de MOS à tilápia-do-nilo durante três semanas, após desafio com *Streptococcus agalactiae*. Andrews et al. (2009) e Torrecillas et al. (2007), também descreveram aumento da sobrevivência de *Labeo rohita* e *Dicentrarchus labrax* alimentados por um período prolongado(60 dias)., com dietas contendo MOS, com níveis de inclusão variando de 1 a 4%. Staykov et al. (2007), apesar de não utilizarem o desafio bacteriano, descreveram um aumento na sobrevivência de truta arco-íris mantidas em densidade elevada quando alimentadas com 2% de MOS. Sahan & Duman (2010), encontraram aumento na contagem de células vermelhas, células

brancas e monócitos de tilápia-do-nilo alimentadas com rações contendo 0,1 e 0,5% de β -glucano, todavia, apenas o grupo alimentado com 0,1% do aditivo apresentaram aumento no número de linfócitos.

e. Conclusões

No presente experimento tanto o β -glucano quanto o MOS não apresentaram os efeitos esperados de modulação do sistema imunológico e aumento da resistência contra patógenos, quando comparados com a oxitetraciclina. Estudos posteriores são necessários para melhor caracterização do nível de inclusão dos aditivos e do período de alimentação adequado.

f. Agradecimentos

Agradecemos FAPESP pelo apoio financeiro e a Biorigin pela doação de ActiveMOS® e MacroGard®.

g. REFERÊNCIAS

ABREU, J.S., MARZOCCHI-MACHADO, C.M., URBACZEK, A.C., FONSECA, L.M., URBINATI, EC. 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Brazilian Journal of Biology*. 69 (4).

- AI Q., MAI K., ZHANG L., TAN B., ZHANG W., XU W., LI H. 2007. Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 394-402.
- ANADÓN, A.; GAMBOA, F.; MARTÍNEZ, M. A.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ, M.; ARES, I.; RAMOS, E.; SUÁREZ, F.H.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. Pharmacokinetics and tissue depletion of chlortetracycline after multiple oral administration to chickens for fattening. *Food and Chemical Toxicology* v.50, p.2714–2721, 2012.
- ANDERSON, D.P & SIWICKI, A.K. 1995. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff M.; Arthur J.R.; Subasinghe R.P. (Editors). *Diseases in Asian Aquaculture II*. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 185-202.
- ANDREWS S.R., SAHU N.P., PAL A.K., KUMAR S. 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquaculture Research*, 41, pp. 61–69.
- BILLER J.D. 2008. Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila*, em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β -glucano. Dissertação (Mestre em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 106p.
- BRIDLE, A.R.; CARTER, C.G.; MORRISON, R.N.; NOWAK, B.F. 2005. The effect of β -glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease evidence of inherent resistance. *Journal of Fish Diseases*, 28, 347–356.

- COLLIER, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, 50, 550-552.
- COUSO N., CASTRO R., MAGARIÑOS B., OBACH A, LAMAS J. 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*. V. 219, I.1-4, P 99-109.
- DIMITROGLOU, A.; DAVIES, S.J.; SWEETMAN, J.; DIVANACH, P.; CHATZIFOTIS, S. 2010. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquaculture Research* 41, 245-251.
- ELLIS A.E. 1981. Stress and modulation of defense mechanisms in fish. pp 147-165 em Cyrino J.E.P, Urbinatti E.C, Fracalossi D.M., Castagnolli N. 2004. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo. TecArt.
- ELLIS, AE. Lysozyme assays. In STOLEN J.S., FLETCHER T.C., ANDERSON D.P., ROBERSON B.S., MUISWINKEL W.B., 1990. (Ed.). *Techniques in Fish Immunology*. USA: SOS publications. p. 101-103.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56, 35-39.
- GOPALAKANNAN A., ARUL V. 2009. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. *Aquaculture Research*, 1-9.
- GOPALAKANNAN A., ARUL V. 2010. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. *Aquaculture Research*, 41(6), 884-892.

- HE, S.; XU, G.; WU, Y., WENG, H.; XIE, H. 2003. Effects of IMO and FOS on the growth performance and non-specific immunity in hybrid tilapia. *Chinese Feed*, 23, 14–15.
- HRUBE, T.C.; SMITH, S.A. 1998. Hematology of fish. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5, 1120-1125.
- LI, P.; WEN, Q.; GATLIN III, D.M. 2009. Dose-dependent influences of dietary β -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*. *Aquaculture Research*, 40, 1578-1584.
- MANSOUR M.R., AKRAMI R., GHOBADI S.H., DENJI K.A., EZATRAHIMI N., GHARAEI A. 2012. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish Physiology and Biochemistry* 38, pp 829–835.
- MISRA, C.K., DAS B.K., MUKHERJEE S.C., PATTNAIK P. 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255(1).
- NOGA E.J. 2010. *Fish Disease: Diagnoses and treatment*. Second edition. Wiley-Blackwell. 382-383.
- PHIBRO. 2012. Tm700. Ficha Técnica. www.phibro.com.br/ft/TM_700.FT.pdf
- RODRIGUES-ESTRADA, U.; SATOH, S.; HAGA, Y.; FUSHIMI, H.; SWEET-MAN, J. 2008. Studies of the effects of Mannan-oligosaccharides, *Enterococcus faecalis* and Poly Hydrobutyric Acid as Immune Stimulant and Growth Promoting Ingredients in Rainbow Trout Diets. *5th World fisheries Congress*, Yokohama, Japan, October 20–25. Abstract 2d-1-5, 158p.

- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. Memórias do Instituto Butantan, v.20, p.329-334, 1947.
- SADO R.Y., BICUDO A.J.A. 2008. Feeding Dietary Mannan Oligosaccharides to Juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Has No Effect on Hematological Parameters and Showed Decreased Feed Consumption. *Journal of the World Aquaculture Society*. 39 (6).
- SAHAN A., DUMAN S. 2010. Influence of β -1,3/1,6 glucan applications on some non-specific cellular immune response and haematologic parameters of healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L., 1758). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 34 (1): 75-81.
- SAHOO P.K & MUKHERJEE S. C. 2001. Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 683–695.
- SAMRONGPAN, C.; AREECHON, N.; YOONPUNDH, R.; SIRSAPOOME, P. 2008. Effects of mannan-oligosaccharides on growth, survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) fry. http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/ISTA8/Abstracts_Papers/Chinnapat's%20full%20paper-Thailand.doc.
- SECOMBES, C.J. AND FLETCHER, T.C. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2: 53–71.
- SPAHN C.M.T., PRESCOTT C.D. 1996. Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *Journal of Molecular Medicine*. 74, pp 423–439.

- STAYKOV, Y.; DENEV, S.; SPRING, P. 2005. Influence of dietary mannan oligosaccharides (Bio-Mos) on growth rate and immune functions of common carp (*Cyprinus carpio*). In: Howal, B.; Flos, R. (Ed.). Lessons from the past to optimize the future. Oostende, *European Aquaculture Society*,. p. 431-432. (Special Publication, 35).
- STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 15, 153–161.
- TORRECILLAS S., MAKOL A., CABALLERO M.J., MONTERO D., ROBAINA L., REAL F., SWEETMAN J., TORT L., IZQUIERDO M.S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.* 23(5), pp 969-81.
- TORRECILLAS S., MAKOL A., BENÍTEZ-SANTANA T., CABALLERO M.J., MONTERO D., SWEETMAN J., IZQUIERDO M.S. (2011) Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Fish & Shellfish Immunology*, 30, pp 674–681.
- WELKER T. L., LIM C., YILDIRIM-AKSOY M., KLESIUS P. H. 2012. Effect of short-term feeding duration of diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents on immune function and disease resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96 (2) pp 159–171.
- WELKER T.L., LIM C., YILDIRIM-AKSOY M., SHELBY R., KLESIUS P.H. 2007. Immune Response and Resistance to Stress and *Edwardsiella ictaluri* Challenge in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Fed Diets Containing Commercial Whole-

Cell Yeast or Yeast Subcomponents. *Journal of the World Aquaculture Society*.
38 (1) pp 24–35.

WHITTINGTON, R., LIM, C., KLESIUS, P.H. 2005. Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 248, 217–225.

WILLMENT J.A., BROWN G.D. 2007. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends in Microbiology*. Vol.16. n°1.

WINTROBE, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51, 32–49.

ZHOU Q.-C., BUENTELLO J.A., GATLIN III D.M. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309 pp 253–257.

ZHOU X.-Q.; LI Y.-L. (2004) The effect of Bio-Mos on intestinal microflora and immune function of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian). In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium (Suppl. 1: Abstracts of posters presented)*. 24–26, p. 109.