UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Parâmetros imunológicos e fisiológicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) **alimentadas com dietas suplementadas com Aquate Fish FT ™**

Carolina Vasconcelos Tavares de Farias

Zootecnista

Jaboticabal, São Paulo

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Parâmetros imunológicos e fisiológicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas suplementadas com Aquate Fish FT ™

Carolina Vasconcelos Tavares de Farias

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi

Tese de apresentada ao Programa de Pós graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo

2021

Farias, Carolina Vasconcelos Tavares de
F224p Parâmetros imunológicos e fisiológicos de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas com dietas suplementadas com Aquate Fish FT ™ / Carolina Vasconcelos Tavares de Farias. – – Jaboticabal, 2021
100 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2021
Orientadora: Leonardo Susumu Takahashi
Banca examinadora: Cristiéle da Silva Ribeiro, João Batista Kochenborger Fernandes, Leonardo Tachibana, Rogério Salvador
Bibliografia

1. Peixe. 2. Fisiologia. 3. Minerais na nutrição. 4. Imunologia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.3.043:591.1

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aqüicultura da Unesp - CAUNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Parâmetros imunológicos e fisiológicos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas suplementadas com Aquate Fish FT™

AUTORA: CAROLINA VASCONCELOS TAVARES DE FARIAS
ORIENTADOR: LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

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

Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena – UNESP

Cristiéle S. Ribeiro

Profa. Dra. CRISTIÉLE DA SILVA RIBEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / UNESP - Câmpus de Ilha Solteira

Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP, Bandeirantes-PR

Prof. Dr. LEONARDO TACHIBANA (Participação Virtual)
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca, IP, São Paulo-SP

Prof. Dr. JOÃO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES (Participação Virtual)
Laboratório de Peixes Ornamentais / Centro de Aquicultura - CAUNESP

Jaboticabal, 26 de abril de 2021

Centro de Aqüicultura da Unesp
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal SP Brasil
Tel 55 16 32032110 ramal 214 fax 55 16 32032268
pgaqui@caunesp.unesp.br www.caunesp.unesp.br

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gingantes”

Issac Newton

DEDICATÓRIA

“A minha família e amigos, pelo amor, compreensão e apoio”.

“Ao meu namorado, pela parceria nas horas mais difíceis”.

“Ao meu orientador pela paciência e amizade”.

“A Alltech e equipe, pela oportunidade de aprender e compartilhar”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida, e de ter dificuldades que me ensinam e ser uma pessoa e profissional melhor.

A minha mãe que me apoiou e incentivou a realizar este sonho, e que em todos os momentos estava do meu lado me mostrando que tudo na vida tem seu lado bom e que a evolução, mesmo que pareça ruim, é necessária.

Ao meu filho Humberto, que tive que ver suas primeiras palavras e aprendizados de longe, mas que sempre tinha um lindo sorriso a cada final de semana que voltava para vê-lo.

Ao meu namorado José Mauro que com sua calma soube superar nossos problemas e que até quando meu humor faltava estava ao meu lado.Aos amigos Michele Carvalho, Mateus Gardino, Amanda Miyuki, Marcio Kishimoto, Luana Camargo, Gabriela Carli, Thaise Mota, Thayse Michielin, Jeisson Celtibero Allan Emilio e Bernardo Ramos, que em pouco tempo de convivência tornaram meus dias mais levas!

Ao meu orientador, professor Dr. Leonardo Susumu Takahashi, pela compreensão e ajuda, por acreditar que esse projeto seria possível e confiar no meu trabalho e não desistirem de me apoiar, com quem aprendi com as broncas, conselhos e risadas. A todos os funcionários do Caunesp (em especial ao Luis), pelo dedicado trabalho que torna o Campus referência nacional.

A Alltech do Brasil pela oportunidade de um emprego onde posso aprender com profissionais de renome e experiência no mercado.

Ao UNIVERSO meu muito obrigada!

APOIO FINANCEIRO

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

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Efeitos imunológicos em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com blande de aditivos e desafiadas com LPS** protocolo nº 3556/20, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 23 de junho de 2020.

Vigência do Projeto	20/08/2020 a 20/10/2021
Espécie / Linhagem	Tilápia do Nilo (*Oreochromus Niloticus*)
Nº de animais	160
Peso / Idade	120g / 6 meses
Sexo	Indeterminado
Origem	Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP (CNPJ: 48.031.918/0001-24)

Jaboticabal, 23 de junho de 2020.

Fabiana Pilarski

Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Efeitos imunológicos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com blend de aditivos

A adição de prebióticos e minerais orgânicos auxiliam na manutenção da saúde e desempenho de animais de produção. Objetivou-se neste trabalho avaliar a combinação entre microminerais e mananoligossacarídeos na resposta imunológica e o desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas contendo diferentes níveis 0; 0,4, 0,8 e 1,2% de Aquate Fish FT, blend comercial composto por cobre, selênio, zinco e mananoligossacarídeos. O experimento foi dividido em dois períodos, aos 30 dias experimentais foram avaliados parâmetros imunológicos e desempenho produtivo, e aos 60 dias os animais foram desafiados com lipopolissacarídeos (LPS), simulando um desafio com bactérias, e então comparado os parâmetros imunológicos antes e após a inoculação do LPS. Adequada fonte e suplementação de microminerais e mananoligossacarídeos é necessária para modular parâmetros imunológicos no intuito de que os animais consigam manter os índices zootécnicos frente a desafios do campo. Em ambos os experimentos (capítulo 2 e capítulo 3) foi possível observar uma resposta fisiológica com a inclusão Aquate Fish FT na dieta dos peixes, demonstrando que o aditivo auxiliou na manutenção da saúde dos animais que receberam a suplementação.

Palavras-Chave: peixe, fisiologia, minerais na nutrição, imunologia.

Immunological effects on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with blend additives.

The addition of prebiotics and organic minerals help in maintaining the health and performance of production animals. The objective of this work is to evaluate the combination of microminerals and mananoligosaccharides in the immunological response and the productive performance of Nile tilapia juveniles (Oreochromis niloticus) fed diets containing different levels 0; 0.4, 0.8 and 1.2% aquate fish ft, commercial blend composed of copper, selenium, zinc and mananoligosaccharides. The experiment was divided into two periods, at 30 experimental days, in which immunological parameters and productive performance were evaluated, and at 60 days, in which the animals were challenged with lipopolysaccharides (LPS), simulating a challenge with bacteria, and then compared the immunological parameters before and after inoculation of the LPS. Adequate source and supplementation of microminerals and mananoligosaccharides is necessary to modulate immunological parameters in order for animals to be able to maintain zootechnical indices in the face of field challenges. In both experiments (chapter 2 and chapter 3) it was possible to observe a physiological response with the inclusion of Aquate Fish FT in the fish diet, demonstrating that the additive aided in the maintenance of the health of the animals that received the supplementation.

Keywords: fish, physiology, minerals in nutrition, immunology.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Metaloenzimas Essenciais para manutenção da saúde e desempenho de Animais Aquáticos. 20

CAPITULO II

Tabela 1 - Composição do Aquate Fish FT. 48
Tabela 2 - Formulação das dietas experimentais. 49
Tabela 3 - Sequência de primers utilizados para análise de expressão gênica em rim de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias. 56
Tabela 4 - Médias dos parâmetros zootécnicos: peso final (PF), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), consumo, conversão alimentar (CA), taxa de eficiência proteica (TEP) e índice hepatossomático (IHS) de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias 57
Tabela 5 - Médias dos parâmetros imunológicos de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias. 58
Tabela 6 - Médias dos parâmetros hematológicos: hematócrito, eritrócitos, leucócitos, trombócitos, eritoblastos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, CGE e basófilos de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias. 59
Tabela 7 - Médias das atividades hepáticas das enzimas do sistema antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias. 60

CAPITULO III

Tabela 1 - Composição do Aquate Fish FT. 80
Tabela 2 - Formulação das Dietas Experimentais. 81
Tabela 3 - Médias da atividade respiratória de leucócitos (burst), concentração de lisozima sérica e concentração de globulina de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 60 dias, antes e depois do desafio com LPS. 88
Tabela 4 - Médias de hematócrito e hemoglobina de tilápia do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 60 dias antes e depois do desafio com LPS. 88
Tabela 5 - Médias da atividade hepática da catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase de tilápia do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 60 dias, antes e depois do desafio com LPS. 89

ANEXO

Tabela 1 - Médias de peso final (PF), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), consumo, conversão alimentar (CA), taxa e eficiência proteica (TEP) e índice hepatossomático (IHS) de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT por 60 dias. 100

LISTA E FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1 - Esquema de ação das enzimas do controle ao estresse oxidativo Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutationa peroxidase (GPX).....32

CAPITULO II

Figura 1 - Efeito na expressão relativa do RNAm dos genes *sod 2, cat 1 e gpx* de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias. 61

Figura 2 - Efeito na expressão gênica dos genes *IL1β e IL8.* 61

CAPITULO III

Figura 1 - Hematócrito de juvenis da tilápia do Nilo alimentadas por 60 dias com diferentes níveis de Aquate Fish FT antes e depois do desafio com LPS. 89

SUMÁRIO

CAPITULO I

1.1 INTRODUÇÃO 17

1.2 MINERAIS NA NUTRIÇÃO DE PEIXES 19

1.2.1 Microminerais 19

1.3 MANANOLIGOSSACARÍDEOS 24

1.4 RESPOSTA IMUNITÁRIA EM PEIXES 25

1.5 RESPOSTAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMATICO 30

1.7 REFERÊNCIAS 33

CAPITULO II

2.1 INTRODUÇÃO 46

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS 47

2.2.1 Aquisição dos Peixes 47

2.2.2 Instalações e Qualidade de Água 47

2.2.3 Dietas Experimentais e Protocolo Experimental 48

2.2.4 Desempenho Zootécnico 50

2.2.5 Parâmetros Imunológicos 51

2.2.5.1 Atividade Respiratória de Leucócitos 51

2.2.5.2 Concentração de Globulinas Totais 51

2.2.5.3 Parâmetros Hematológicos 52

2.2.6 Enzimas do Sistema Antioxidante 53

2.2.7 Expressão gênica - PCR em Tempo Real (qPCR) 54

2.2.8 Análise Estatística 56

2.3 RESULTADOS 57

2.3.1 Desempenho Zootécnico 57

2.3.2 Parâmetros Imunológicos 57

2.4 DISCUSSÃO 62

2.5 CONCLUSÃO 67

2.6 REFERENCIAS 67

CAPITULO III

3.1 INTRODUÇÃO 77

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS 79

3.2.1 Instalações e Qualidade de Água.....79

3.2.2 Dietas Experimentais e Protocolo Experimental 80

3.2.3 Desafio com Lipopolissacarídeos (LPS).....82

3.2.4 Desempenho Zootécnico.....82

3.2.5 Parâmetros Imunológicos Avaliados 83
3.2.5.1 Atividade de Lisozima.....83
3.2.5.2 Atividade Respiratória de Leucócitos 83
3.2.5.3 Concentração Sérica de Globulinas.....84
3.2.5.4 Parâmetros Hematológicos 84
3.2.6 Enzimas do Sistema Antioxidante 84
3.2.7 Análise Estatística.....86

3.3 RESULTADOS.....86

3.3.1 Parâmetros Imunológicos.....86

3.4 DISCUSSÃO.....90

3.5 CONCLUSÃO.....94

3.6 REFERÊNCIAS.....94

3.7 ANEXO 01.....100

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade multidisciplinar, que se refere ao cultivo de diversos organismos aquáticos, incluindo as plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes. A piscicultura é um dos segmentos da aquicultura praticada em várias culturas distintas e manejada há alguns séculos. Existem evidências deste relato em documentos e manuscritos chineses de séculos remotos (OLIVEIRA, 2009). Desde então, o desenvolvimento tecnológico nas áreas de nutrição, manejo e genética vem tornando a atividade cada vez mais competitiva.

A piscicultura brasileira cresceu 5,93% em 2020, terminando o ano com a produção de 802.930 toneladas de peixes cultivados, dentre as espécies se destaca o cultivo de tilápias, que representa 60,6% da produção nacional (PEIXE BR, 2021). A intensificação dos cultivos e a concentração dos empreendimentos em parques aquícolas, ou polos de produção, traz benefícios com o aumento na escala de produção, otimizando o uso de infraestruturas, serviços, e a possibilidade de alcançar uma melhor organização e representação do setor produtivo. No entanto, essa concentração impõe desafios, especialmente no que diz respeito à biossegurança dos cultivos (SANTOS, 2009a).

Com isso, imunomoduladores dietéticos surgem como uma alternativa viável para prevenção de doenças, já que o estado nutricional é considerado um fator importante e que determina a capacidade do peixe em resistir a doenças. Neste contexto, tem se intensificado pesquisas objetivando maior entendimento sobre a nutrição e o fortalecimento da resposta imune dos peixes a fim de definir a função dos alimentos que influenciem na resistência a doenças (LALL, 2002).

Aditivos alimentares podem estimular o sistema imunológico dos peixes, por isso as dietas devem ser formuladas não somente com critérios produtivos, mas também considerando a capacidade desses aditivos em promover a higidez destes animais (KIRON, 2012). Estes aditivos nutricionais são utilizados para melhorar a saúde intestinal, reduzir problemas com enfermidades e melhorar o aproveitamento dos alimentos, se tornando assim uma ferramenta importante para se manter a lucratividade do cultivo (RIDHA; AZAD, 2012). Entre os aditivos mais estudados, estão os probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, enzimas exógenas, extratos vegetais e fitoterápicos. Os prováveis substitutos de

promotores de crescimento devem manter a ação benéfica dos antibióticos e eliminar as indesejáveis, como resistência bacteriana (LODDI et al., 2000).

Um aditivo comumente utilizado na nutrição animal, como ingredientes não digeríveis por enzimas digestíveis normais, que atuam estimulando seletivamente a sobrevivência e atividade de bactérias do intestino e melhorando a saúde do hospedeiro são os prebioticos, eles atuam indiretamente sobre o sistema imune e enzimático, pois estimulam o crescimento das populações de bactérias benéficas, que têm a capacidade de produzir substâncias com propriedades imuno estimulatórias e interagir com o sistema imune em vários níveis (SILVA; NÖRNBERG, 2003). Os prébioticos mais importantes são os oligossacarídeos: frutoligossacarídeos, glucoligossacarídeos e mananoligossacarídeos (IMMERSEEL et al., 2002).

O uso de alguns microminerais também apresentam relação com maior grau de proteção em peixes, sua adição como ferramenta imunomoduladora pode ser utilizada de modo profilático durante períodos críticos do ciclo produtivo, como por exemplo a larvicultura, manejos de classificação, transporte ou vacinação, auxiliando para uma saúde preventiva por meios nutricionais, já que nestes momentos os animais se tornam mais susceptíveis a agentes infecciosos, (JENEY; ANDERSON, 1993).

Toda cadeia produtiva ganha com o uso de mananoligossacarídeos e diferenciada suplementação de microminerais na dieta de peixes, sendo pela promoção na melhoria da saúde, pois algumas espécies importantes, como a tilápia, filtram microalgas e materiais orgânicos particulados no ambiente, favorecendo a entrada de microrganismos no trato digestivo, aumentando as chances de colonização do intestino por bactérias patogênicas (KIRON, 2012). Ou pela menor possibilidade de deficiência ou intoxicação de minerais, pelo fato de os minerais orgânicos serem mais biodisponível (APINES-AMAR et al., 2004), sendo possível colocar menores quantidades quando comparado aos inorgânicos (ROSTAGNO et al., 2017), não interagirem com outros compostos da dieta (sendo mais absorvidos) e não competirem por sítios de absorção (SIGNOR, 2006).

1.2 MINERAIS NA NUTRIÇÃO DE PEIXES

O fornecimento de dietas com deficiência nutricional acarreta muitos entraves no cultivo (SOARES et al., 2000), por isso é indicado fornecer alimentos que possuam em sua composição níveis balanceados e completos de aminoácidos, vitaminas e minerais na dieta, que atendam a exigência dos animais nas diferentes fases de seu desenvolvimento. Em sua maioria, as ações metabólicas dos micronutrientes são específicas e interdependentes, por isso avaliar a ação conjunta destes nutrientes talvez seja a melhor forma de investigação (HALVER, 2002).

Todas as formas de vida exigem minerais para manter suas atividades (McDOWELL, 2003). Estes são classificados de acordo com a quantidade exigida na dieta e concentração no tecido do animal, os microminerais são exigidos em maior quantidade (fósforo, enxofre, cálcio, magnésio, sódio, potássio e cloro) e os micro minerais em menor (cobalto, cromo, cobre, iodo, manganês, selênio, ferro e zinco).

A quantidade de minerais ingerida visa manter o equilíbrio homeostático no organismo, ou seja, absorve-se mais quando não existe uma reserva, mas por outro lado, o excesso de um determinado mineral pode interferir no aproveitamento do outro devido a interação que estes possuem entre eles. (SILVA; SILVA, 1999).

1.2.1 Microminerais

Os microminerais servem como componentes para estruturas de tecidos, rotas metabólicas e possuem papel importante na osmorregulação e balanço acidobásico (JOBLING, 2001). Também chamados de elementos traço, são componentes de hormônios e enzimas (Tabela 1), servem como cofatores e ativadores de uma variedade de enzimas, além de participarem de uma variedade de processos bioquímicos (NRC, 2011).

Isso se deve a sua habilidade em suprir parte de suas exigências através da assimilação de íons do ambiente aquático, dificultando a determinação da exigência nutricional (SANZ, 2009; NRC, 2011). É notável maior esforço para se compreender a ação de micronutrientes que possuem relação com papel imunológico em peixes. Alguns microminerais por exemplo, possuem função de

auxiliar no sistema antioxidante e imunológico do organismo, sendo estes o cobre, ferro, selênio, manganês e zinco (HARDY, 2001) (Tabela1).

Tabela 1 - Metaloenzimas Essenciais para manutenção da saúde e desempenho de Animais Aquáticos.

Elemento Traço	Enzima	Função
Cobre	Citocromo oxidade	Oxidase terminal
	Lisil Oxidade	Oxidação da lisina
	Ceruloplastina (ferroxidase)	Utilização do ferro, transporte do cobre
	Superoxido dismutase	Dismutaçao do radical livre superóxido O_2^-
Ferro	Succinato desidrogenase	Oxidação aeróbica de carboidratos
	Citocromo (a,b, c)	Transferência de elétrons
	Catalase	Proteção contra peróxidos
Manganês	Piruvato carboxilase	Metabolismo do piruvato
	Superoxido dismutase	Dismutação do radical livre supeóxido (O_2^-)
Selênio	Glutationa peroxidase	Remoção dos peróxidos
	Deiodinase tipo I e III	Conversão do tiróxido para sua forma ativa
Zinco	Anidrase carbônica	Formação de gás carbônico
	Alcool desidrogenase	Metabolismo de álcool
	Carboxipeptidases	Digestão de proteína
	Alcalino fosfatase	Hidrólise de ésteres fosfatados
	Polimerases	Síntese de RNA e DNA
	Colagenase	Cicatrização de feridas

Fonte: LALL (2002) modificado (YAMAMOTO, 2011).

Cobre é um micromineral essencial para todos os animais. É componente de uma série de metaloenzimas e suas respectivas funções como: a produção de energia (citocromo c oxidase), proteção de células contra radicais livres (superóxido dismutase), neurotransmissores (dopamina hidroxilase e monoxigenase α-amidante de peptidil glicina), síntese de colágeno (lisil oxidase) e produção de melanina (tirosinase) (LALL, 2002).

Este elemento traço também está relacionado com o metabolismo do ferro durante a hematopoiese e na sua absorção, sendo a ceruloplasmina, um complexo cobre-proteína, que oxida o ferro para a forma férrica (Fe^{3+}) viabilizando seu transporte para outros tecidos (LOVELL, 1998). A exigência desse mineral depende do estado fisiológico do animal, da quantidade de cobre disponível na água, além dos níveis de zinco, ferro, cádmio e molibdênio na ração, os quais são antagonistas ao cobre inorgânico (WATANABE et al., 1997).

Em laboratório, a exposição da truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss)* durante cinquenta dias com dietas e ambiente pobres em cobre mostraram que a deficiência pode acarretar crescimento reduzido e baixa conversão alimentar (KAMUNDE et al., 2002). Também pode provocar desenvolvimento de catarata, atividades reduzidas ao citocromo c oxidase e da cobre-zinco superóxido dismutase (LALL, 2002).

O excesso desse mineral pode causar efeitos nocivos ao organismo, como a intoxicação hepática e formação de complexos insolúveis junto a outros minerais, resultando na sua não absorção (FERRARI et al., 2004). O primeiro sinal de toxidez é a produção de radicais livres no tecido onde o cobre é acumulado (BURY et al., 2003). A alimentação com níveis tóxicos pode causar redução no crescimento, conversão alimentar, danos às brânquias e necrose do fígado e rins (WATANABE et al., 1997).

Selênio é essencial para a proteção das células e dos tecidos contra a ação oxidativa causada por compostos oxigenados reativos e radicais livres formados especialmente durante processos infecciosos e de formação de tumores. É componente das selenoproteínas, entre elas a glutationa peroxidase, importante enzima antioxidante que atua em conjunto com a vitamina E na prevenção de danos às membranas das células por oxidação (LIU et al., 2010).

São conhecidos os efeitos do selênio e seus compostos contra a toxicidade de metais pesados como cádmio e mercúrio (LALL, 2002). Este mineral também foi identificado como cofator do metabolismo da glicose (LOVELL, 1998). A deficiência em selênio pode reduzir a resposta imunológica, devido à redução na atividade das células de defesa, redução na concentração de imunoglobulinas no sangue e na produção de anticorpos e menor proliferação de linfócitos T (NICOLAOU, 2000).

Níveis elevados na dieta podem ter efeito tóxico, resultando em uma redução no crescimento, eficiência alimentar e aumento na mortalidade (WATANABE et al., 1997). O híbrido de robalo (*Morone chrysops x Morone saxatilis*) apresentou redução de crescimento, menor consumo, eficiência alimentar e mortalidade quando alimentados com ração utilizando selênio de sódio como principal fonte, com um teor de 20 mg de Se/kg (JARAMILLO JR et al., 2009), sendo que sua exigência é próxima a 0,3 a 0,5 mg/kg (NRC, 2011).

O zinco participa como componente ativo ou cofator de importantes sistemas enzimáticos e é componente essencial para um grande número de metaloenzimas: a anidrase carbônica, carboxipeptidase A e B, álcool desidrogenase, desidrogenase glutâmica, D-gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase, alcalino fosfatase, superóxido dismutase e DNA polimerase (LIM et al., 2001; NRC, 2011). Assim, este micromineral regula muitos processos, tais como o metabolismo de carboidratos, proteína e lipídios (LALL, 2002). Ele também pode ter participação na estruturação de nucleoproteínas, no metabolismo de prostaglandinas e na armazenagem de insulina na forma complexada com zinco (WATANABE et al., 1997; LALL, 2002).

A deficiência de zinco está associada a um maior tempo de cicatrização de feridas (FOUNTOLAKI et al., 2010) e redução no crescimento em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas com baixo teor de zinco (1 mg de Zn/kg) (DO CARMO E SÁ et al., 2004). Além de redução de apetite, catarata, erosão na pele e nadadeiras, baixa produtividade de gametas e taxa de eclosão, nanismo e mortalidade (LALL, 2002). Já o fornecimento de doses excessivas de zinco pode ocasionar em interações antagônicas com outros elementos-traço que podem competir por um mesmo sítio de ligação, podendo assim ocasionar deficiência de outro mineral (SIGNOR, 2006).

Os minerais orgânicos, ao invés de utilizar as vias normais de captação de íons no intestino delgado (usadas pelos minerais inorgânicos) são capazes de utilizar vias de captação de peptídeos ou aminoácidos. Desse modo, a competição entre minerais pelo mesmo transportador é evitada. Além disso, os minerais orgânicos são mais estáveis e protegidos bioquimicamente das reações adversas com outros nutrientes presentes na dieta, por isso apresentam maior biodisponibilidade (CLOSE, 1998). A ligação molecular (covalente ou iônica), dependendo da estrutura atômica do mineral, pode influenciar na biodisponibilidade (COZZOLINO, 1997).

Essas biomoléculas tornam-se estruturalmente mais estáveis, o que confere uma maior proteção ao micromineral durante o processo digestivo e sua absorção pelo trato intestinal. Esta conformação limita suas interações com outros componentes da dieta, como inibidores ou outros microminerais, estando

desta forma mais disponível e sendo melhor absorvidos quando comparado às fontes inorgânicas de minerais (APINES-AMAR et al., 2004). Houve um aumento do interesse na nutrição de peixes pela utilização de novas fontes de minerais, como os microminerais quelatados com carboidratos, aminoácidos ou proteínas, por sua maior disponibilidade comparado às fontes inorgânicas (APINES et al., 2003; SARKER et al., 2007).

Foi determinada que a inclusão ótima de sulfato de cobre para garoupa (*Epinephelus malabaricus*) está entre 4 a 6 mg/kg de ração, pois os peixes apresentaram maior ganho de peso e maior atividade hepática da enzima cobre-zinco superóxido dismutase (LIN et al., 2007). Posteriormente este estudo foi reavaliado visando utilizar o quelatado peptídeo de cobre (Bioplex Cobre Alltech) como principal fonte micromineral e foram adotados os mesmos parâmetros para determinar a exigência, obtendo-se valores inferiores entre 2 a 3 mg de Cu/kg de ração (LIN et al., 2010).

A suplementação com fonte orgânica de selênio (SelPlex Alltech) para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) reduziu o efeito tóxico do cádmio quando os peixes foram mantidos em água com teores elevados de sulfato de cádmio, além da diminuição do resíduo desse elemento traço no corpo do animal (ABDEL-TAWWAB; WAFEEK, 2010). O bagre africano (*Clarias gariepinus)* alimentado com a mesma fonte orgânica de selênio 0,03 mg de Se/kg apresentou maior desempenho no crescimento, melhor conversão alimentar e melhora dos parâmetros imunológicos contra a toxidez de cobre (ABDEL-TAWWAB et al., 2007).

Lin e Shiau (2007) avaliaram o efeito da adição crescente do selênio (selenometionina) e decrescente do cobre (sulfato de cobre) na dieta da garoupa (*Epinephelus malabaricus*). Nesse estudo foi observado que parâmetros como atividade respiratória de leucócitos, atividade da lisozima e concentração total de hemoglobina aumentaram, sugerindo que o selênio auxilia na imunidade dos animais. A exigência e disponibilidade do complexo selenometionina, levedura selenizada e selenito de sódio foram avaliadas para o bagre do canal (*Clarias gariepinus)*, para um maior ganho de peso as fontes orgânicas, selenometionina e levedura selenizada, foram exigidas em 0,09 e 0,11 mg de Se/kg

respectivamente, e 0,28 mg de Se/kg para o selenito de sódio (WANG; LOVELL, 1996).

Em robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) alimentado com fonte orgânica de zinco (Bioplex Zinco Alltech) apresentou maior nivel de retenção do mineral no epitélio com a suplementação de 148 mg de Zn/Kg. Foi observado também que apesar de não haver acúmulo do micromineral no músculo, houve na pele e no fígado (FOUNTOULAKI et al., 2010). O proteinato de zinco e o sulfato de zinco foram testados para o híbrido de robalo (*Morone chrysops x Morone saxatillis)*, sendo 17 mg de Zn/kg (sulfato de zinco) o nível ideal para manter o crescimento ótimo do animal, a fonte de proteinada de zinco se mostrou 1,7 vezes mais disponível que a fonte inorgânica (BUENTELLO et al., 2009),

Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com 10 mg de zinco/kg na forma de proteinato apresentam maior ganho de peso (mais 44%) entre os tratamentos quando comparados aos peixes alimentados com sulfato de zinco na mesma dosagem. Isto sugere que 10 mg de zinco/kg de dieta via sultado de zinco não atende a exigência, ao contrário da fonte orgânica testada, demonstrando melhor desempenho pela maior biodisponibilidade do mineral (MOURA et al., 2012).

1.3 MANANOLIGOSSACARÍDEOS

Gibson e Roberfroid (1995) relataram que mananoligossacarídeos são pequenos polímeros de manose encontrados em maior quantidade em componentes de células de leveduras. Estes componentes presentes na *Saccharomyces cerevisiae* e derivados quando utilizados na alimentação, determinam incremento da resposta inflamatória, inclusive aumentando a resistência contra patógenos (ORTUÑO et al., 2002).

Os mananoligossacarídeos, conhecidos entre os nutricionistas como MOS, são glicoproteínas extraídas e purificadas a partir das membranas da levedura. As partículas do MOS não são digeridas pelo animal e passam intactas pelo trato digestivo. No intestino, as partículas se ligam aos receptores de glicoproteínas presentes nas membranas celulares das bactérias da microflora intestinal. Estes compostos atuam diretamente sobre algumas populações de

bactérias patogênicas (Gram-negativas), pois eles se ligariam às fímbrias que as bactérias patogênicas utilizam para fixação, tornando-as indisponíveis para a aderência no trato gastrointestinal, fazendo com que estas sejam eliminadas por exclusão competitiva (SPRING et al., 2000; GIBSON; ROBERFROID, 1995).

O MOS dificulta aderência de bactérias no intestino e isso ocorre de duas formas, a primeira através do maior estímulo de produção de mucina associado a presença de partículas de MOS no intestino e a segunda forma envolve a aderência das partículas de MOS à membrana celular das bactérias, que acabam sendo eliminadas nas fezes, junto com os MOS (ANDREWS et al., 2009).

Até o final dos anos 80 as tilápias eram mais produzidas em viveiros com sistema extensivo, com a intensificação dos cultivos ocorrida há pouco mais de duas décadas, as fazendas se multiplicaram e a densidade de cultivo aumentou, contribuindo para aumento de enfermidades. Cepas de bactérias cada vez mais agressivos vêm causando prejuízos aos produtores e esse desafio vêm demandando mais atenção nas investigações sobre as necessidades de nutrientes (aminoácidos, minerais, vitaminas, ácidos graxos, e outros) e prebióticos (MOS) não apenas para maximizar o desempenho, mas também, fortalecer a imunidade (KUBTIZA, 2018).

1.4 RESPOSTA IMUNITÁRIA EM PEIXES

Para se proteger contra potenciais patógenos, os peixes contam com diversos mecanismos de defesa, que podem ser divididos em dois componentes: os mecanismos de defesa inato (não específico) e mecanismo de defesa adquirido (específico ou memória imunológica). Os mecanismos de defesa não específicos contam com dois componentes. O componente externo, que é composto pelas barreiras mecânicas de defesa, entre elas o muco, as escamas e a pele. E o componente interno ou sistêmico que reúne diversos tipos de células de defesa, enzimas líticas como a lisozima e muitas substâncias (complementos) que ajudam a células de defesa a se localizar, identificar, neutralizar ou destruir os antígenos (corpos estranhos que invadem o organismo). O termo “não específico” indica que esse sistema combaterá a

qualquer tipo patógeno ou corpo estranho que desafia o animal (RANZANI PAIVA et al., 2014).

A ocorrência de infecção geralmente é favorecida pela participação de fatores genéticos do microrganismo e/ou fatores fisiológicos do próprio hospedeiro, que podem determinar a resistência ou suscetibilidade à doença. Desta forma, a predisposição do indivíduo a determinada doença, pode ser maior ou menor, dependendo da sua resposta à agressão. Esta capacidade resulta da união das respostas imunes específicas e não específicas, sendo influenciada pela frequência de determinados genes do próprio hospedeiro (CALICH et al., 1998).

O sistema inato é o mais antigo mecanismo imunológico e é caracterizado por ser não específico e, portanto, não dependendo do reconhecimento prévio da superfície estruturas do invasor. Ele tem a vantagem de ser indutível por moléculas externas, e reagir dentro de uma escala de tempo muito curta (BAYNE, 2003).

Como organismo aquático, o corpo de peixes é submetido a contato contínuo com muitos tipos diferentes de microrganismos. A primeira barreira contra patógenos é equipada com mecanismos protegendo contra a entrada de patógenos (SECOMBES, 1997). Pele, brânquias e intestino são os tecidos mucosos associados ao sistema imunológico dos peixes por fornecerem a proteção física aos peixes (DALMO et al., 1997).

Nos seres humanos e em outros animais (aves e mamíferos) as células sanguíneas de defesa geralmente são sintetizadas na medula óssea e nos nódulos linfáticos. Como os peixes não possuem medula óssea nem nódulos linfáticos, a produção das células sanguíneas e de defesa ocorre no rim anterior, no baço e no timo (COSTA, 2007).

Componentes humorais da resposta não específica inibem a adesão e colonização de microrganismos e ocorrem em soro, muco, pele, brânquias e intestino. Um destes componentes é a lisozima, que em peixes é um fator de defesa comum em superfícies expostas ao ambiente, incluindo brânquias e trato intestinal, além de ser encontrado em circulação em sangue (SAURABH; SAHOO, 2008).

É um dos parâmetros inatos mais estudadas em peixes e sua resposta pode ser induzido muito rapidamente e não apenas relacionados com a presença de bactérias, mas também para outras situações de alarme, como depois estresse (DEMERS, et al. 1997; ROTLANT, et al. 1997), possui capacidade de promover a lise da parede celular das bactérias Gram-positivas através da quebra nas ligações β-1,4 glicosídicas entre os ácidos nacetilmurâmico e N-acetilglicosamínico (PAULSEN et al., 2003) e quando age em conjunto com as proteínas do sistema complemento, é capaz também de causar lise na parede celular de bactérias Gram-negativas (PAULSEN et al., 2001).

Os leucócitos realizam reconhecimento de antígenos e a montagem da resposta imune, sendo produzidos em órgãoes linfóides, como timo e baço (RANZANI PAIVA, 2007). Durante a fagocitose de patógenos, leucócitos aumentam seu consumo de oxigênio através do NADPH oxidase e geram várias espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion radical superóxido (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio livre (O_2) e o radical hidroxila (OH^-) em um processo chamado atividade respiratória de leucócitos. (KLEBANOFF, 1999). A atividade respiratória de leucócitos, também conhecida como burst oxidativo (burst) tem sido frequentemente utilizada como um indicador de imunidade inespecífica em peixes (SAHOO; MUKHERJEE, 2002; SAHOO ET al., 2005).

O sistema complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Está constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como expressas na membrana celular, e é ativado por diversos mecanismos e desempenham um papel importante em diferentes tipos de reações imunoinflatórias (TURRY et al. 2001). Esta ativação pode ocorrer por três vias: alternativa, lítica (vias das manoses) e clássica. A via alternativa é mais ativa em peixes do que em mamíferos, e ocorre por meio do reconhecimento de microrganismos de forma não específica. A via lítica pode ser ativada pela ligação com a manose da superfície dos microrganismos, e a via clássica depende da interação antígeno-anticorpo, sendo este um mecanismo específico de defesa (SUNYER, et al. 1997).

Os dois principais tipos de proteínas do plasma são albumina e globulinas, suas funções estão relacionadas com o transporte de substâncias e com a

regulação e a manutenção da pressão coloidosmótica sanguínea. Atuam no sistema imune, fatores de coagulação e proteínas transportadoras. Geralmente, são classificadas em alfa, beta e gamaglobulinas (também denominadas imunoglobulinas) (THRALL, 2007).

Ao contrário dos mamíferos e das aves que apresentam cinco tipos de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgD, IgG e IgM), as tilápias apresentam apenas um tipo, a IgM. Dentre as proteínas do plasma, as imunoglobulinas destacam-se por suas funções na imunidade, pois desempenham papel importante no mecanismo de defesa imune humoral por reconhecer e interagir com componentes estranhos no organismo (THRALL, 2007). Os linfócitos apresentam diferentes subpopulações que são responsáveis pela resposta humoral além da celular do organismo (PADUA et al., 2009). Dividem-se em linfócitos B e T; os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos participando da resposta imune específica humoral. Os linfócitos T desempenham funções específicas (TIZARD, 2002):

Linfócitos T auxiliares: distinguem antígenos específicos desencadeando mensageiros químicos que estimulam a atividade celular, como os fagócitos, linfócitos B e outros linfócitos T.

Linfócitos T citotóxicos: migram para o local da infecção e liberam substâncias tóxicas que destroem as células estranhas.

Linfócitos T supressores: contêm a resposta imune quando a infecção já está controlada.

Linfócitos T memória: são células inativas que se ativam em contato com o mesmo antígeno que causou a infecção anterior.

A concentração de linfócitos nos peixes ainda é bastante variada, pois recebe influência de diversos fatores como sua espécie, as condições de coleta, armazenamento e processamento do sangue e variações ambientais (FERNANDEZ et al., 2002).

Diversas células corporais contribuem com o mecanismo de defesa não específico nos peixes, as células do sangue de peixes são as mesmas de qualquer outro vertebrado, com algumas variações na morfologia e talvez na função. Os glóbulos brancos (leucócitos) estão diretamente ligados a função imunológica e possuem diversas funções relacionadas a defesa contra patógenos. São divididos em 3 principais grupos: linfócitos, monócitos e

granulócitos. Sendo granulócitos: neutrófilos, basófilos e os eosinófilos (RANZANI PAIVA et al., 2014).

Os demais parâmetros são importantes para demonstrar o estado de saúde dos animais, sendo este os glóbulos vermelhos (eritrócitos), que tem como função principal o transporte de oxigênio para as células. Plaquetas são células de defesa orgânica, envolvendo principalmente a coagulação sanguínea, mas também realizam fagocitose, especialmente na remoção de fragmentos celulares. Além disso, possuem a habilidade de migração para foco inflamatório (TAVARES DIAS et al., 2007). Algumas espécies de peixes possuem células que não são encontradas em outros vertebrados, como é o caso do leucócito granular PAS positivo, também conhecido como célula granulocítica especial (CGE) (RANZANI PAIVA et al., 2014).

Os eritrócitos dos peixes são células com núcleo delimitado pela carioteca e com variadas organelas delimitadas por membranas, sendo elas ativas e com funções determinadas. Em peixes, anfíbios, répteis e aves os eritrócitos possuem núcleo, diferente do encontrado em mamíferos, onde são anucleados, contém poucas organelas e curto período de vida. A função destas células consiste no transporte de gases respiratórios, por meio de ligação com a hemoglobina (SATAKE et al., 2009).

Leucócitos apresentam diferentes subpopulações que são responsáveis pela resposta humoral e celular do organismo (PADUA et al., 2009). Monócitos são os maiores leucócitos presentes na circulação e principais fagócitos dos peixes (TAVARES DIAS; MORAS, 2004), possuem habilidade de migração dos vasos sanguíneos até o foco inflamatório por meio de quimiotaxia durante processos infecciosos (SANTOS et al., 2009b). Linfócitos são os menores leucócitos encontrados no sangue circulante dos peixes e os mais abundantes na maioria das espécies (TAVARES DIAS et al., 1999).

Entre os granulócitos, os neutrófilos são as células primárias que combatem os processos iniciais de inflamação nos peixes, mediante a infecção bacteriana, são os neutrófilos que aparecerão, realizando fagocitose destes agentes (RANZANI PAIVA et al., 2014). Basófilos são os leucócitos dificilmente observados no sangue circulante da maioria das espécies (CLAUSS et al., 2008),

sua função ainda não está elucidada em peixes, embora exista evidência de sua participação no processo de fagocitose, especialmente na remoção de fragmentos celulares (SATAKE et al., 2009). Os eosinófilos possuem função ainda incerta nos peixes, embora existam evidências de sua participação em processos de defesas contra parasitos, assim como observado em vertebrados (MARTINS et al., 2004), este granulócitos circulam por determinado tempo e migram para os tecidos sob estímulo de infecção (RANZANI PAIVA, 2007).

A célula granulocítica especial até o momento não tem elucidada sua função. Possui a habilidade de migração para foco inflamatório em processos induzidos experimentalmente, mas não se sabe qual sua participação neste sistema de reações (MARTINS et al., 2009).

1.5 RESPOSTAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMATICO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas e degradadas por organismos aeróbios, e são encontradas em concentrações fisiológicas dentro das células para um funcionamento adequado (NORDBERG; ARNER, 2001). O estresse oxidativo irá ocorrer quando a taxa de produção dessas espécies reativas de oxigênio excede a taxa de sua decomposição por sistemas antioxidantes, levando a um aumento do dano oxidativo em diferentes alvos celulares (ALMEIDA et al., 2005).

As EROs podem reagir com a maioria das biomoléculas, iniciando uma cadeia de formação de radicais livres. Para que essa reação seja finalizada, o radical livre deve reagir com outro radical livre, eliminando os elétrons desemparelhados, ou reagir com um composto antioxidante (NORDBERG; ARNER, 2001). As vias de biotransformação de compostos químicos acabam também por gerar espécies reativas de oxigênio, algumas enzimas associadas a este processo em peixes são: enzimas citicromo P450 (principalmente) na fase I, seguido pela conjugação da fase II, pela ação das enzimas glutationa S transferase (GST) e UDP glutationa transferase (UDPGTs). O sistema antioxidante capaz de combater esses radicais faz parte do metabolismo de desintoxicação dos organismos (VAN DER OOST et al., 2003).

Caso o sistema de defesa antioxidante esteja comprometido, pode ser estabelecido um desequilíbrio pró-oxidante celular, denominado estresse oxidativo, que, por sua vez, está associado a vários processos patológicos. As enzimas-chave que fazem parte do sistema de defesa antioxidante são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidade (GPx) (VAN DER OOST et al., 2003). As SODs são um grupo de metaloenzimas que catalisam a transformação de radicais superóxido ($O_{2}^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Equação 1). Em células eucarióticas, o radical superóxido pode ser metabolizado na mitocôndria pela SOD dependente de Manganês (Mn-SOD) e no citosol pela SOD dependente de Cobre ou Zinco (Cu/Zn-SOD) (NORDBERG; ARNER, 2001).

$$2O_{2}^{\cdot -} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (1)$$

Existem diferentes tipos de SOD que podem variar quanto a sua estrutura e localização. Nos peixes, assim como nos demais animais, existem duas formas de SOD que contêm cobre e zinco, a CuZn-SOD; uma delas corresponde à enzima presente principalmente no citoplasma das células, mas que também pode estar presente nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembranoso das mitocôndrias; um outro tipo de CuZn-SOD corresponde à SOD extracelular, normalmente associadas à superfície das células, especialmente nos vasos sanguíneos. Um terceiro tipo de SOD é aquele que contém um íon Mn^{+3} e está localizado na mitocôndria. A Mn-SOD desempenha papel central na regulação da concentração de O_{2-} intra-mitocondrial e, portanto, na proteção da mitocôndria contra o estresse oxidativo (HERMES LIMA, 2004).

As CATs são heme-enzimas encontradas dentro de peroxissomos e promovem a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Equação 2) (VAN DER OOST et al., 2003; ZHANG et al., 2004). A catalase contêm ferro que facilita a remoção do peróxido de hidrogênio, que é metabolizado para oxigênio molecular e água, conforme a reação a seguir:

$$2H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O \quad (2)$$

A vantagem da função antioxidante da catalase é que a eliminação do H_2O_2 impossibilita a formação do radical hidroxil, como acontece na reação de Fenton (Equação 3) produzida por metais de transição, que podem estar presentes em proteínas como a ferritina (NORDBERG; ARNER, 2001).

$$2H_2O_2 + Cu+/Fe^{2}+ \rightarrow OH + OH^{-} + Cu^{2+}/Fe^{3+} \quad (3)$$

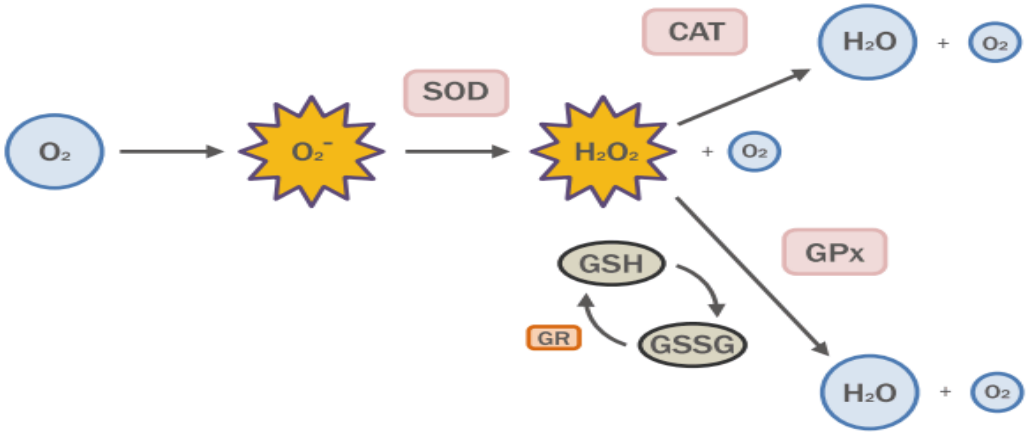
A GPx catalisa a redução de peróxidos lipídicos e de hidrogênio (ZHANG et al., 2004). Todas as isoformas utilizam a glutationa como doadora de elétrons, transformando os peróxidos orgânicos em álcoois (Equação 4) (NORDBERG; ARNER, 2001).

$$ROOH + 2GSH - \rightarrow ROH + GSSG + H2O \quad (4)$$

Basicamente, a GPx reduz peróxidos utilizando os elétrons da glutationa oxidada (GSH) gerando, assim, glutationa dissulfeto (GSSG). A GSSG pode ser novamente reduzida a GSH pela ação da glutationa redutase (GR), que utiliza os elétrons do NADPH (NORDBERG; ARNER, 2001; VAN DER OOST et al., 2003).

A GPx é uma enzima citólica dependente de selênio que possui um papel muito importante dentro do sistema antioxidante, visto que previne danos às biomembranas relacionados à peroxidação lipídica (VAN DER OOST et al., 2003).

Figura 1 - Esquema de ação das enzimas do controle ao estresse oxidativo Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutationa peroxidase (GPX).



Fonte: E-Science Central.

O melhor entendimento dos nutrientes e aditivos sobre o sistema enzimático do estresse oxidativo, imunidade e expressão de genica são importantes ferramentas para dar suporte aos resultados obtidos com as variáveis de desempenho produtivo rotineiramente avaliados. Exploraremos nos próximos capítulos as respostas de desempenho produtivo e expressão de genes relacionados ao sistema enzimático do estresse oxidativo (Capítulo 2) e imunidade e resposta ao desafio com LPS (Capítulo 3) de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com aditivo comercial composto por microminerais orgânicos e mananoligossacarídeos por 30 dias (Capítulo 2) e 60 dias (Capítulo 3).

1.7 REFERÊNCIAS

ABDEL-TAWWAB, M.; MOUSA, M. A. A.; ABBASS, F. E. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. **Aquaculture**, Amsterdan; v. 272, p. 335-345, 2007.

ABDEL-TAWWAB, M.; WAFEEK, M. Response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) to environmental cadmium toxicity during organic selenium supplementation; **Aquaculture**, v. 42, p.106-114,2010.

ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; DAFRE, A. L.; GOMES, D. O.; MEDEIROS, M. G. H.; MASCIO, P. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,** v. 318, p. 21-30, 2005.

ANDREWS, S. R.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; KUMAR, S. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. **Aquaculture research,** v. 41, n. 1, p. 61-69, 2009.

APINES, M. J. S.; SATOH, S.; KIRON, V.; WATANABE, T.; FUJITA, S. Bioavailability and tissue distribution of amino acid-chelated trace elements in

rainbow trout *Oncorhynchus* fish. **The Journal Of Experimental Biology**, v. 206, p. 11-23, 2003.

APINES-AMAR, M. J. S., SATOH, S., CAIPANG, C. M. A., KIRON, V., WATANABE, T., AOKI, T. Amino acid-chelated: a better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture.** Amsterdan, v. 240, p. 345-358, 2004.

BAYNE, C. J. Co Evolution of innate and adaptative immunity. **Integrative and Comparative Biology,** n. 43, p. 291-299, 2003.

BUENTELLO, J. A.; GOFF, J.B.; GATTLIN III, D. M. Dietary zinc requirement of hybrid striped bass, *Morone chrysops x Morone saxatillis*, and Bioavailability of two chemical different zinc compounds. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 40, n. 5, p. 687-693, 2009.

BURY, N. R.; WALKER, P.A.; GLOVER, C. N. Nutritive metal uptake by teleost mykiss. **Fisheries Science**, v. 69, p. 722-730, 2003.

CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Research Immunology**, v. 149, p. 407-417, 1998.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. N.; ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish. **Veterinary Clinics Exotics Animal Practice**, v.11, p. 445-462, 2008.

CLOSE, W. H. The role of trace mineral proteinates in pig nutrition. In: Alltech's Annual Symposium, 14., 1998, **Nottingham**. Anais. Nottingham: Alltech, p. 376-469, 1998.

COSTA, G. M. Estudo histomorfológico e análise dos perfis celulares do rim cefálico, fígado, baço e timo do *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887, Teleósteo, Characidae), pacu. Mestrado Universidade de São Paulo, 2007.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição**, v. 10, n. 10, p. 87-98, 1997.

DO CARMO E SÁ, M. V.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA, P. M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juvenile diets. **Aquaculture**, v. 238, p. 385-401, 2004.

DALMO, R.; INGEBRIGTEN, K.; BOGWALD, J. Non specific defence mechanisms in Fish, with particular reference to the reticuloendothelial system. **Journal Fish Diseases.** n. 20, p.242-273, 1997.

DEMERS, N. E.; BAYNE, C. J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in raibow trout. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 21, n. 3, p. 63-73, 1997.

E-SCIENCE CENTRAL, disponível em: <https://www.e-sciencecentral.org/articles/SC000029005>. Acesso em:11/07/2020.

FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista AquaTic**, v. 16, 2002.

FERRARI, J. E. C.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; GONÇALVES, G. S.; HISANO, H.; KLEEMAN, G.K. Níveis de cobre para a tilápia do Nilo*, Oreochromis niloticus*. **Acta Scientarum Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 429-436, 2004.

FOUNTOLAKI, E.; MORGANE, H.; RIGOS, G.; ANTIGONI, V.; MENTE, E.; SWEETMAN, J.; NENGAS, I. Evaluation of zinc supplementation in Europe sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile diets. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 208-216, 2010.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics**. Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, p. 401-412, 1995.

HARDY, R. W. Nutritional deficience in comercial aquaculture: likelihood, onset and identification. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D (eds). **Nutrition and Fish Health.** The Haworth Press Inc. Binghamton, New York, p.131-147, 2001.

HALVER, J. E.; HARDY, R. W. **Fish Nutrition**. London: Academic Press. HILTON, J. W. 1989. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. **Aquaculture**; v. 79, p. 223-244, 2002.

HERMES LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. (ed.) **Functional metabolismo: regulation and adaptation**, Ney Youk, John Wiley e Sons, Inc. p. 319-368, 2004.

IMMERSELL, F. V.; CAUWERTS, K.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; Feed aditives to control salmonella in poultry. **World Poultry Science Journal**, v. 58, p. 501-5013, 2002.

JARAMILLO JR., F.; PENG, L.; GATLIN III, D. M. Selenium nutrition of hybrid striped bass (*Morone chrysops x M. saxatilis*) bioavailability, toxicity and interactions with vitamin E. **Aquaculture Nutrition**, v.15, p. 160-165, 2009.

JENEY, G.; ANDERSON, D. P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to lin bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, p. 51-58, 1993.

JOBLING, M., Feed Composition and Analysis. In: HOULIHAN, D., BOUJARD, T., JOBLING, M., Food Intake In fish, Oxford-UK, **Blackwell-Science**, p. 1-21, 2001.

KAMUNDE, C.; CLAYTON, C.; WOOD, C.M. Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. **American Journal of Physiology** – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 283, p. 69-78, 2002.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology,** v. 173, p. 111-133, 2012.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolites from phagocytes. In GALLIN, J.L., SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic principles and clinical correlates**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins p. 721-768, 1999.

KUBTIZA, F.; Avanços na nutrição da tilápia: desempenho, imunidade e qualidade da carne. **Panorama da Aquicultura.** Edição 169, 2018.

LALL, S. P.; The Minerals. In: HALVER, John E.; HARDY, Ronald. W.Fish **Nutrition Third Edition Washingtown**: Academic Press, p. 260-300, 2002.

LIM C.; KLESIUS, P.H.; WEBSTER, C.D. The role of dietary phosphorus, zinc, and selenium in fish health. In: LIM, Chhorn; WEBSTER, Carl D. **Nutrition and Fish health.** New York: Food Products Press. p. 201-212, 2001.

LIN, Y. H., SHIE, Y.; SHIAU, S. Y. Dietary copper requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus***.** **Aquaculture**, v. 274, p.161-165, 2007.

LIN. Y. H., SHIAU, S. Y. The effect of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus,* fed high copper. **Aquaculture**, v. 267, p. 38-43, 2007.

LIN, Y. H.; et al. Dietary copper requirement reevaluation for juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*, with an organic copper source. **Aquaculture**, v. 310, p.173-177, 2010.

LIU, K.; WANG, X. J.; AJ, Q.; MAI, K., ZHANG, W.; Dietary selenium requirement for juvenile cobia*, Rachycentron canadum* L. **Aquaculture Research,** v. 41, n. 10, p. 594 - 601, 2010.

LOVELL, T. Dietary Requirements**.** In: **Nutrition and feeding of fish**. 2. ed. Auburn: Kluwer Academic Publishers, p. 61-68, 1998.

MARTINS, M. L.; TAVARES DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T. Haematological alterations of Leporinus macrocephalus (*Osteichtyes: Anostomidae*) naturally ingected by Goezia leporini (Nematoda: *Anisakidae*) in Fish pond. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 640-646, 2004.

MARTINS, M. L.; MYIAZAKI, D. M. Y.; TAVARES DIAS, M. FENERICK Jr. J.; ONAKA, E. M.; BOZO, F.; FUJIMOTO, R. Y.; MORAES, F. R.; Caracterization of the acute inflamatory respone in the hybrid tambacu (*Poaractus mesopotamicus*

Colossoma macropomum female) (*Osteichthye*s). **Brasilian Jounal of Biology**, v. 69, p. 631-637, 2009.

McDOWELL, L.R. Minerals in animal nutrition. Second Edition Amsterdan: **Elsevier Science**, p. 614, 2003.

MOURA, G. S. M.; SHAFER, B.; LANNA, E. A. T.; GLENNY, P.; FILER, K. Fontes de zinco em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Anais da 49º **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnica**. A produção animal no mundo em transformação, p.1-3, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washingtown: National Academic Press; p.164-184, 2011.

NICOLAOU, K. C.; WINSSIGER, N.; HUGHES, R.; SMETHURST, C.; CHO, S. Y. et al. ZUSCHRIFTEN-New Selenium-Based Safety-Catch Linkers: Solid Phase Semisynthesis of Vancomycin. **Angewandte Chemie.** German Edition, v. 112, n.6, p. 1126-1130, 2000.

NORDBERG, J.; ARNER, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, R. C. O Panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, 2009.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Oral admistration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune responses of gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.85, p.41-50, 2002.

PADUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M.; SATAKE, F.; HISANO, H.; TAVARES DIAS, M. Valores para leucograma e trombograma de juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*) em condições experimentais de cultivo. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, v. 31, p. 282-287, 2009.

PAULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 23-37, 2001.

PAULSEN, S. M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. In vivo effects of Bglucan and LPS on regulation of lysozyme activity and Mrna expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Shell fish Immunology**, v.14, p. 39-54. 2003.

PEIXEI BR; **Anuário Peixe BR da Piscicultura**; Associação Brasileira da Piscicultura; 2021.

RANZINI PAIVA, M.J.T. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In. BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; **2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes.** Anais, p. 47-51, 2007.

RANZANI PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.P.; TAVARES DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análide hematológica em peixes**, 1ª ed.; EDUEM 2014.

RIDHA, M. T.; AZAD, I. S. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. **Aquaculture Research**, v.43 – 6, p. 843- 852, 2012.

ROTLANT, J.; TORT, L.; Cortisol and glucose response after acute stress in the sparid red porgy (*Pagrus pagrus*) previously subjected to crowding stress. **Journal Fish Biology**, n. 51, p.21-29, 1997.

ROSTAGNO, H. S.; ALGINO, L. F. T.; HANNAS, M. I.; DONZELE, J. L.; SAKOMURA, N. K.; PERAZZO, F. G.; SARAIVA, A.; ABREU, M. L. T.; RODRIGUES, P. B.; OLIVEIRA, R. F.; BARRETO, S. L. T.; BRITO, C. O. **Tabelas brasileiras para aves e suínos** n. 4, 2017.

SAHOO, P. K., KUMARI, J.; MISHRA, B. K. Non- specific immune responses in juveniles of Indian major caps. **Journal of Applied Ichthyology.** v.21, n. 2, p. 151-155, 2005.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. The effects of dietary immunomodulation upon *Edwarsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rahio*). **Fish and Shelfish Immunology**, v. 12, v. 1, p. 1 – 16, 2002.

SAURABH, S.P; SAHOO, K. Lysozyme: an important defence molecule of Fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39: p. 223-239, 2008.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M. Disturbios morfológicos em células sanguíeneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In TAVARES DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** 1º ed. Macapá: Embrapa Amapá, p. 330-345, 2009.

SANTOS, G. L.; LUDKE, M. C. M. M.; LIMA, R.; Extratos vegetais como aditivos para rações de peixes. **Revista eletrônica nutritime,** v. 6, n. 1, p. 789-800, 2009a.

SANTOS, A. A.; EGAMI, M.I.; RANZANI PAICA, M.J.T.; JULIANO, Y. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): seasonal veriation, sex and gonadal maturation. **Aquaculture**, v. 296, p. 359-366, 2009b.

SANZ, F. (Org**.). La nutrición y alimentación en piscicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009.

SARKER, S. A.; SATOH, S.; KIRON, V. Inclusion of citric acid and/or amino acidchelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream Pagrus major. **Aquaculture,** Amsterdan, v. 262, p. 436-443, 2007.

SECOMBES, C. J.; OLIVER, G.; Host pathogen interactions in salmonids In: Bernoth, Elis, Midtlying, Oliver, Smith, eds. Furunculosis: multidisciolinary **Fish diase research.** London, Academic Press, p. 269-296, 1997.

SIGNOR, A. Desempenho produtivo e resistência ao estresse pelo frio da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com levedura autolisada e zinco. Dissertação de mestrado; Caunesp, Jaboticabal, 2006.

SILVA DA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 983-990, 2003.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P.; Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 1, n. 12, p. 21-32, 1999.

SOARES, C. M.; HAYASHI, C.; GONÇALVES, G. S.; GALDIOLI, E. M.; BOSCOLO, W. R. Plâncton, Artemia sp, dieta artificial e suas combinações no desenvolvimento e sobrevivência do quinguio (*Carassius auratus*) durante a larvicultura. **Acta Scientiarum**, v.22, p. 383-388, 2000.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, A.; NEWMAN, K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-chalenged broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 205-211, 2000.

SUNYER, J. O.; TORT, L.; LAMBRIS, J. D.; Diversity of the thirt formo d complemente, C3, in Fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid Fish *Sparus aurata* **Biochemical Journal**, n. 326, p. 877-881, 1997.

TAVARES DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Vilimpress, p. 144, 2004.

TAVARES DIAS, M; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. Can thrombocytes participe in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost Fish? A cutochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthiology**, v. 23, p. 709-712, 2007.

TAVARES DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; CAMPOS FILHO, E. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (*osterichthyes, Characidae*) em sistema de monocultivo intensivo. II Leucócitos. **Revista brasileira de Zoologia,** v. 16, p. 175-185, 1999.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**: uma introdução. São Salmosalaro: Roca, p. 532, 2002.

THRALL, M.A. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca, p. 582, 2007.

TURRY, G. R. I.; AMAMOTO Y. C. P.; PORTINHO, C. P. Sistema Complemento: Ativação, Regulação e Deficiências Congênitas e Adquirida. **Revista da Associação Brasileira de Medicina. v**. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessement: a review. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

WANG, C.; LOVELL, R. T., Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than inorganic selenium source, sodium selenite in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 152, p. 223-234, 1996.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, Amsterdan, v. 151, p. 185-207,1997.

YAMAMOTO, F.Y. Microminerais (Cu, Fe, Mn, Se e Zn) na nutrição de peixes, uma revisão bibliográfica. (Conclusão de curso em Engenharia de Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catariana, Florianópolis, 2011.

ZHANG, J. F.; GUO, H. Y.; WU, J. C.; XUE, Y. Q.; Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 58, n. 1, p. 110-116, 2004.

CAPÍTULO II

AQUATE FISH FT EM DIETAS PARA A TILAPIA DO NILO: GANHO DE PESO, RESPOSTAS IMUNES, SISTEMA ANTIOXIDANTE E EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES *sod2, cat1, gpx, IL -1β* e *IL-8*

RESUMO - A suplementação de minerais orgânicos e a inclusão de mananoligossacarideos em dietas para peixes podem melhorar o estado de saúde dos peixes. Vários estudos sobre o tema demonstram melhora em parâmetros imunes e no sistema antioxidante enzimatico com a utilização destes nutraceuticos. O Aquate Fish FT é um produto comercial composto por microminerais orgânicos e mananoligossacarídeos que auxilia na manutenção da saúde e desempenho dos animais. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição do blend comercial na dieta sobre as respostas imunológicas, fisiológicas, desempenho zootécnico e expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante enzimático e imune em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados 160 juvenis de tilápias (10 animais/caixa) distribuídos em 16 caixas de 200 L. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (0; 0,4; 0,8 e 1,2% de Aquate Fish FT) e 4 repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.0. Os resultados de expressão gênica foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerado uma forma ajustada para analisar as mudanças relativas de expressão gênica. Aos 30 dias de alimentação, foi realizada biometria dos peixes e foram coletas amostras de sangue, fígado, rim e baço, de dois peixes por caixa. Foram avaliados o desempenho zootécnico, parâmetros imunológicos, hematológicos, enzimas do sistema antioxidante e a expressão de genes relacionados a imunidade e estresse oxidativo. Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) no desempenho zootécnico entre os níveis de inclusão do Aquate Fish FT. Diferenças significativas foram observadas na atividade respiratória de leucócitos, sendo observado maior valor nos animais que receberam as dietas com 0,8 e 1,2% do Aquate Fish FT. Dentre os parâmetros de estresse oxidativo, foi observada maior atividade hepática da enzima superóxido dismutase nos peixes que receberam a dieta com 0,8% em comparação ao controle. A expressão gênica realizada no rim cranial do gene *cat* foi maior nos peixes que receberam a dieta com 1,2% quando comparada com a dieta controle e com 0,4% e a *IL 1β* foi menor nos peixes alimentados com dieta com 0,4% quando comparada com 0,8%. Os resultados encontrados sugerem uma inclusão de 0,8 a 1,2% de AquateFish FT como melhor resposta imunológica.

Palavras-chave: mananoligossacarídeos, imunodulador, minerais orgânicos.

ABSTRACT - Supplementation of organic minerals and the inclusion of mananoligosaccharides in fish diets may improve fish health status. Several studies on the subject have demonstrated improvement in immune parameters and in the enzyme antioxidant system with the use of these nutraceutics. Aquate Fish FT is a commercial product composed of organic microminerals and mananoligosaccharides that assists in maintaining the health and performance of animals. The aim of this study was to evaluate the effects of the addition of commercial blend in the diet on immunological, physiological responses, zootechnical performance and gene expression related to enzymatic and immune antioxidant systems in Nile tilapia juveniles (Oreochromis niloticus). We used 160 tilapia juveniles (10 animals/box) distributed in 16 boxes of 200 L. The experiment was conducted in a completely randomized design with 4 treatments (0. 0.4, 0.8 and 1.2% aquate fish FT) and 4 replicates. The results obtained were submitted to variance analysis (ANOVA) and the means compared by the Tukey Test (5%), through the statistical program SAS, version 9.0. The results of gene expression were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, considered an adjusted way to analyze the relative changes of gene expression. At 30 days of feeding, fish biometrics were performed and blood, liver, kidney and spleen samples were collected from two fish per box. Zootechnical performance, immunological parameters, hematological parameters, antioxidant system enzymes and the expression of genes related to immunity and oxidative stress enzyme were evaluated. No differences were observed in zootechnical performance ($p>0.05$) between the inclusion levels of Aquate Fish FT. Significant differences were observed in the respiratory activity of leukocytes, and a higher value was observed in the animals that received the diets with 0.8 and 1.2% of the Aquate Fish FT. Among the parameters of oxidative stress, higher hepatic activity of the enzyme superoxide dismutase was observed in fish that received the diet with 0.8% compared to the control. The gene expression performed in the cranial kidney of the cat gene was higher in fish that received the diet with 1.2% when compared to the control diet and with 0.4% and the IL 1β was lower in fish fed a diet with 0.4% when compared with 0.8%. The results suggest an inclusion of 0.8% as the best immunological response.

Keywords: mananoligosaccharides, immunodulator, organic minerals.

2.1 INTRODUÇÃO

O oficial sênior da FAO compartilhou dados de pesquisa que revelam que as participações no mercado internacional de proteína animal são de 20% para carne bovina, 15% de porco e frango e 50% de pescado. Segundo ele, este alto número se dá em virtude da diversidade de espécies que o pescado oferece, se comparado às outras proteínas animais, o que gera um grande fluxo comercial (FAO, 2020).

A aquicultura tem sido apontada como uma resposta para os problemas resultantes da diminuição das populações selvagens de pescado. Para que a produção atinja seu maior potencial e atenda esta demanda, precisa-se de um bom desenvolvimento dos peixes, porém o estresse e as condições ambientais são problemas comuns e de difícil controle que aumentam a susceptibilidade a doenças oportunistas, problemas fisiológicos e deficiência no sistema imunológico. Como alternativa profilática, diversos estudos vêm focando em diferentes modelos biológicos, estratégias nutricionais para modular a imunidade e otimizar o desempenho produtivo (COSTA et al., 2007).

Imunomoduladores são ferramentas nutricionais que auxiliam no aumento da imunocompetência e resistência a doenças, sua utilização é viável como uma alternativa a utilização de fármacos. Essa classe de aditivos, também chamada de alimentos funcionais, tem sido utilizada como meio de aumentar a imunocompetência e resistência a doenças (KYLE NEWMAN, 2001). O Aquate Fish FT é uma combinação de aditivos selecionados, composto por diferentes proporções de minerais orgânicos como zinco, selênio, cobre, além de mananoligossacarídeos.

A expressão de genes relacionados a resposta imune tem implicações importantes para demonstrar a robustez do peixe sobre o efeito de diferentes tratamentos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à suplementação da dieta com uma mistura contendo zinco orgânico (9,30%); selênio orgânico (0,30%); cobre orgânico (0,021%) e mananas (3,80%) no desempenho produtivo, parâmetros imunológicos, hematológicos de enzimas do estresse oxidativo e avaliação da expressão de genes relacionados às enzimas do estresse oxidativo e imunidade.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos de manipulação de animais foram submetidos à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Campus de Jaboticabal e foram realizados de acordo com os preceitos e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Certificado n°. 003556-CEUA).

2.2.1 Aquisição dos Peixes

Juvenis machos (revertidos) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus)*, com peso médio de 10 g foram adquiridos da empresa Spring Genetics (Fazenda Santa Terezinha, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). Antes da fase experimental, os peixes foram aclimatados por 40 dias às condições laboratoriais em caixas de polietileno 200 L alimentados três vezes ao dia, até a saciedade aparente.

2.2.2 Instalações e Qualidade de Água

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Tilapicultura do Centro de Aquicultura (CAUNESP - Jaboticabal, SP, Brasil), da Unesp - Universidade Estadual Paulista. Cento e sessenta animais (peso médio 63,56 ± 4,41 g) foram distribuídos em 16 caixas de polietileno (200 L) na densidade de dez peixes por caixa. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (níveis de inclusão) e quatro repetições.

Os tanques foram instalados em sistema fechado, composto por filtro mecânico e filtro biológico, com renovação de aproximadamente dez vezes ao dia. A matéria orgânica depositada no fundo das caixas, durante todo o experimento e sempre que necessário, foi removida através de sifonamento com uma mangueira de borracha. Os tanques eram dotados de aeração e com sistema de escoamento de água diretamente do fundo, facilitando a saída de excretas e resíduos alimentares.

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água, mensurados semanalmente, permaneceram dentro do adequado para o desenvolvimento da tilapia: oxigênio dissolvido igual a 5,45 ± 0,66 mg/L e temperatura igual a 23,74 ± 0,50º C (ProODO Optical Dissolved Oxygen Instrument, Yellow Springs, Ohio, USA), pH igual a 6,95 ± 0,16 (ProPlus Multiparameter Instument, Yellow Springs,

Ohio, USA) e concentração de amônia total igual a 12,3 ± 0,72 µg/L (Reagentes de Nessler), adequados para o ideal crescimento e desenvolvimento dos animais (KUBTIZA, 2013).

2.2.3 Dietas Experimentais e Protocolo Experimental

Foram formuladas quatro dietas práticas isoprotéicas (28% de proteína bruta) e isoenergéticas (4.000 kcal EB/kg) e que atenderam às exigências nutricionais da espécie segundo recomendações de Furuya et al. (2010). Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 30 dias até a saciedade aparente, em duas refeições diárias (09h00m e 16h00m).

Foi considerada saciedade aparente o momento em que os animais deixaram de consumir os peletes de ração, desta forma as rações foram fornecidas em pequenas porções durante alguns minutos, com cautela e observação do comportamento animal, para que não houvesse sobra de alimento. O consumo de ração foi medido diariamente por meio de pesagem dos recipientes de armazenagem da ração de cada caixa. Foram avaliados quatro níveis de inclusão (0; 0,4; 0,8 e 1,2%) do Aquate Fish FT (Alltech, São Pedro do Ivaí, Brasil) (Tabela 1).

Os ingredientes foram triturados em moinho de martelo (peneira de 0,8 mm) e misturados conforme a formulação das dietas experimentais (Tabela 2). A mistura foi extrusada com adição de água (30%) e levados à estufa à 45° C por 48 horas. As dietas foram armazenadas em potes plásticos e conservadas sob refrigeração (4°C) durante todo o experimento.

Tabela 1 - Composição do Aquate Fish FT.

	Nível de garantia (mínimo)
Proteína	192 g/kg
Mananas	8.400 mg/kg
Zinco	20,6 g/kg
Selênio	60 mg/kg
Cobre	26,6 mg/kg

Tabela 2 - Formulação das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	**Aquate Fish FT**			
	0,0%	0,4%	0,8%	1,2%
Milho Moído	28,0	28,0	28,0	28,0
Farelo de Soja	28,0	28,0	28,0	28,0
Farelo de Trigo	18,0	18,0	18,0	18,0
Farinha de Vísceras	11,3	11,3	11,3	11,3
Farinha de Carne	6,3	6,3	6,3	6,3
Farelo de Arroz Cru	5,0	5,0	5,0	5,0
Premix Vitámico[1]	0,5	0,5	0,5	0,5
Antifúngico[2]	0,3	0,3	0,3	0,3
Fosfato Bicálcico	0,2	0,2	0,2	0,2
L-Lisina	0,2	0,2	0,2	0,2
DL-Metionina	0,2	0,2	0,2	0,2
Antioxidante[3]	0,01	0,01	0,01	0,01
Caulim	1,5	1,1	0,7	0,3
Aquate Fish FT[4]	0,0	0,4	0,8	1,2
***Com*posição Estimada (% MS)**				
Proteína Bruta, %	28,0	28,0	28,0	28,0
Proteína Digestíveis %	23,8	23,8	23,8	23,8
Extrato Etéreo, %	5,5	5,5	5,5	5,5
Fibra Bruta, %	4,3	4,3	4,3	4,3
Matéria Mineral, %	7,4	7,4	7,4	7,4
Energia Bruta kcal/kg	4000,0	4000,0	4000,0	4000,0

[1]Premix MCassab, níveis de garantia do produto: vitamina A, 500.000 UI; vitamina D3, 250.000 UI; vitamina E, 5.000 mg; vitamina K3, 500 mg; vitamina C, 10.000 mg; vitamina B1, 1.000 mg; vitamina B2, 1.000 mg; vitamina B6, 1.000 mg; vitamina B12, 2.000 mg; pantotenato de cálcico, 4.000 mg; niacina, 2.500 mg; ácido fólico, 500 mg; biotina, 10 mg; cloreto de colina, 100.000 mg; Cu, 1.000 mg; Fe, 5.000 mg; I, 200 mg; Co, 50 mg; inositol 1.000 mg; Mn, 5.000 mg; Se, 30 mg; Zn, 9.000 mg. [2]Mold-zap Alltech, composição: ácido propiónico tamponado. [3] Banox Alltech [4]Aquate Fish FT com níveis de garantia mínimos: zinco 20,6 g/kg; manganês 8400 mg/kg; selênio 60 mg/kg e cobre 26,6 mg/kg.

Após o período de 30 dias de alimentação experimental, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, anestesiados em solução de benzocaína (1 g/5 L de água), individualmente pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01 g, medidos em ictiômetro, para posterior cálculo dos parâmetros de desempenho produtivo. Para análise de parâmetros imunológicos, os animais foram submetidos à coleta de sangue por meio de punção do vaso caudal. Foram utilizadas seringas sem anticoagulante para a obtenção de soro, que foi

destinado para determinação da concentração de proteína total, albumina e cálculo das globulinas. Microtubos com anticoagulante (heparina) foram utilizados para armazenamento do sangue destinado à determinação da atividade respiratória de leucócitos e determinação do hematócrito.

A separação das alíquotas do sangue foi realizada pela centrifugação (Allegra x-30R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA) logo após a coleta (10 minutos, 875 g, à 10º C) para separação do plasma, e após uma hora à temperatura ambiente para separação do soro. Ambas foram armazenadas à -18º C.

Os mesmos animais utilizados na coleta de sangue foram laparotomizados e foi realizada a coleta e pesagem do fígado. Parte da amostra foi armazenada para determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo. O material foi envolvido em papel alumínio previamente identificados e armazenadas em ultrafreezer a -80º C. Com peso do fígado foi determinada o índice hepatossomático (IHS) de acordo com a fórmula: [100 x (peso do tecido/peso vivo)].

Adicionalmente, dois animais de cada caixa (oito animais por tratamento) foram submetidos à coleta de rim cranial e fígado com material metálico esterilizado. As amostras obtidas foram acondicionadas em microtubos estéreis, livres de RNAse, congelados em nitrogênio líquido e conservados em freezer a -80ºC até o processamento laboratorial das análises de expressão gênica.

2.2.4 Desempenho Zootécnico

Com os dados biométricos e de consumo de ração, foram calculados e avaliados os seguintes parâmetros de desempenho, segundo Tacon, (1990):

- Peso Final (PF);

- Ganho em peso diário:

GP (g/dia) = (peso final – peso inicial) / período experimental;

- Taxa de crescimento específico:

TCE (%/dia) = 100 x [(ln peso final – ln peso inicial) / período experimental];

- Consumo alimentar diário:

CAD (g/dia) = alimento consumido / período experimental;

- Conversão alimentar aparente:

CA = alimento fornecido / ganho em peso total;

- Taxa de eficiência protéica:

TEP (%) = 100 x (ganho em peso total / proteína bruta consumida).

2.2.5 Parâmetros Imunológicos

2.2.5.1 Atividade Respiratória de Leucócitos

O método consistiu na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo "burst" oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante "*nitroblue tetrazolium*" (NBT) que formam precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, Saint Louis, USA).

Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25° C. Após incubação 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetil formamida DMF, (Sigma, Saint Louis, USA). e centrifugado a 3000 rpm por 5 min (Allegra x-30R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA). O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de *formazan* liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (Genesys 10S Spectrophotomete, Thermo Scientific, Waltham, USA).

2.2.5.2 Concentração de Globulinas Totais

A concentração de proteína total foi determinada no soro pelo método do biureto (CAIN; SKILLETER, 1987) e a de albumina pelo método colorimétrico – verde de bromocresol (Albumina, REF. 419, Gold Analisa Diagnóstica Ltda,

Belo Horizonte, Brasil). A concentração de globulinas foi obtida pelo cálculo entre a diferença de concentração das proteínas totais e da albumina.

2.2.5.3 Parâmetros Hematológicos

A partir das amostras de sangue com heparina, procedeu-se a determinação do hematócrito, contagem total de eritrócitos e concentração de hemoglobina. Extensões sanguíneas foram confeccionadas e utilizadas na contagem total e diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, granulócito: (neutrófilos, basófilo e eosinófilos)) e célula granulocítica especial (CGE)

Amostras de sangue foram introduzidas em capilares para microhematócrito. Os capilares foram centrifugados por 5 min a 13.000 rpm em centrífuga de microhematócrito e a avaliação foi feita com o auxílio da tabela de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). Para a contagem do número de eritrócitos, alíquotas de sangue de cada animal foram diluídas na proporção de 1:200, em solução de formol-citrato 4% (NATT; HERRICK, 1952). Após a homogeneização da solução a contagem foi realizada em câmara de Newbauer.

Extensões sanguíneas de cada animal foram feitas em lâminas de vidro com extremidade fosca e foram deixadas para secar ao ar e submetidas à coloração de pelo método de Rosenfeld, (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz as contagens totais de leucócitos e trombócitos foram realizadas por método indireto, pela quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas. Já o diferencial de leucócitos foi quantificado contando-se 200 células e estimando para o total de leucócitos.

$$Leucócitos\ (por\ \mu L) = \frac{n^0 leucócitos\ x\ n^0 total\ de\ eritrócitos\ (por\ \mu L)}{2000\ eritrócitos\ contados\ na\ extensão\ sanguínea}$$

$$Trombócitos\ (por\ \mu L) = \frac{n^0 trombócitos\ x\ n^0 total\ de\ eritrócitos\ (por\ \mu L)}{2000\ eritrócitos\ contados\ na\ extensão\ sanguínea}$$

2.2.6 Enzimas do Sistema Antioxidante

As amostras de fígado foram inicialmente descongeladas para preparação de um homogenato na concentração de 1 g de tecido para 4 mL de tampão de homogeneização (Tris HCl 100mM, EDTA 0,1 mM e triton x-100 a 0,1%, pH 7,8). O homogenato foi preparado em um homogeneizador tipo Potter (Modelo 136, Novatecnica, Piracicaba, Brasil) a 600 rpm por aproximadamente 3 minutos cada amostra. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugados a 5000 rpm, por 30 min em centrífuga refrigerada (4º C) (Allegra x-30R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA).

Após centrifugação, os sobrenadantes foram separados em alíquotas para análise da atividade das enzimas do sistema antioxidante. No mesmo dia de preparo dos homogenatos, foi quantificada a concentração de proteína de cada amostra pelo método de Biureto (CAIN; SKILLETER, 1987) em espectrofotômetro a 540 nm (Genesys 10S Spectrophotomete, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade hepática da SOD (EC 1.15.1.1) foi medida pelo método do ferricitocromo C usando xantina / xantina oxidase como fonte de radicais superóxido. O coquetel de reação consistiu em tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 7,8), EDTA a 0,1 mM, xantina a 0,1 mM, citocromo C a 0,013 mM e xantina oxidase a 0,024 UI/mL. A atividade foi expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma inibição de 50% da taxa de redução do ferricitocromo C (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009). A atividade da SOD foi determinada pela absorbância a 550 nm, à 25º C, em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Catalase (CAT)

A atividade hepática da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada medindo a diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio pela absorbância a 240 nm de acordo com Aebi (1984). O coquetel de reação consistiu em H_2O_2 10,6

mM preparado no momento da utilização. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato por minuto sob as condições analíticas descritas. A atividade da CAT foi determinada pela absorbância a 240 nm, à 25º C, em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Glutationa Peroxidase (GPx)

A atividade hepática da GPx (EC 1.11.1.9) foi medida seguindo o método de Pérez-Jiménez et al. (2009). A glutationa na forma oxidada (GSSG) gerada pela GPx foi reduzida pela glutationa redutase (GR) e a oxidação de NADPH foi monitorada pela absorbância a 340 nm. O coquetel de reação consistiu em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,1), 3,6 mM de glutationa reduzida (GSH), 3,6 mM de azida de sódio, 1 UI/mL de glutationa redutase, 0,2 mM de NADPH e 1,2 mM de H_2O_2. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato µmol por minuto, nas condições analíticas descritas. A atividade da GPx foi determinada pela absorbância a 340 nm, à 25º C, em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA).

2.2.7 Expressão gênica - PCR em Tempo Real (qPCR)

Extração de RNA, Síntese de cDNA e PCR de Transcrição Reversa (RTq-PCR)

As análses de expressão gênica foram realizadas no Laboratório do Instituto de Pesca - Pirassununga, com a participação dos pesquisadores: Dr. Miguel Frederico Fernandez Alarcor e Dr. Leonardo Tachibana.

A extração do RNA total do rim foi realizada utilizando o Mini kit RNA total Aurum (Biorad Laboratories, Hercules, USA). Aproximadamente 30 mg do tecido foi pulverizado em almofariz contendo nitrogênio líquido. Após maceração, duas alíquotas de 10 mg de material foram transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL, e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente mantidas em freezer -70º C até o início da extração de RNA. Uma alíquota de 10 mg de cada parcela experimental foi utilizada na extração de RNA conforme o protocolo do fabricante.

A quantidade e a pureza do RNA foram avaliadas com um espectrofotômetro (Multiskan EON Spectrophotomete, Biotek Instruments Winooski, USA), e a qualidade analisada com o bioanalisador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

A síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT) foi realizada em amostras acima de 60 ng/µL de RNA total, utilizando-se o kit comercial iScript Reverse Transcription Supermix para RT-qPCR (Biorad Laboratories, Hercules, USA) e oligo (dT) como iniciador. Um tratamento de remoção de DNAses foi feita por dois minutos a 45° C.

Para as reações de transcrição reversa, foi adicionado 15 µL de RNA total, 5 µL do mix de transcriptase reversa, para um volume final de 20 µL. A reação de síntese do cDNA foi realizada em termociclador (Biorad Laboratories, Hercules, USA), e anelamento dos iniciadores a 25° C por três minutos. A reação prosseguiu com a extensão da fita a 45° C por 10 min, seguida de inativação da enzima a 85° C por 5 min. As amostras foram quantificadas pelo espectrofotômetro de microplacas (Eon. Biotek Instruments, Winooski, USA) e ajustadas a 100 ng/µL, para armazenamento em freezer a -80°C para posterior realização do PCR em tempo real.

A determinação de expressão gênica foi realizada para 5 genes ligados às enzimas do estresse oxidativo e resposta imune, *cat1; sod 2; gpx, IL1β* e *IL8 descritos* por Shahin et al. (2019), Ming et al. (2013) e Xie et al. (2016). Foram realizadas curvas de eficiência para cada primer. O gene þ-actin foi utilizado como controle endógenos da reação (HE et al., 2013; SHAHIN et al., 2019) (Tabela 3). As reações de RT-qPCR consistiram em 6,25 µL de SYBR Green (Biorad Laboratories, Hercules, USA), 2,5 µL de cada primer, 2 µL de DNA metagenômico (solução de trabalho) e água ultrapura para elevar o volume da reação a 12,5 µL. As reações de RT-qPCR foram realizadas em termociclador (Biorad Laboratories, Hercules, USA), seguindo o protocolo de amplificação (desnaturação inicial e ativação de enzimas) nas condições: 95 º C por 30 s, seguido por 39 ciclos de 95º C por 5 s, 60º C por 30 s e uma etapa final de 95° C por 10 s. No final da corrida, um protocolo de dissociação foi aplicado para obter as curvas de dissociação

Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os primers utilizados nas reações de qPCR forão elaborados de acordo com Xie et al. (2016) e Shahin et al., (2019). A especificidade desses primers foi avaliada *in silico*, utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Os resultados das reações de RT-qPCR foram analisadas com o software Biorad CFX Manager 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA) e os valores de Ct (threshold cicle) ou ciclo de quantificação (Cq) foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3 - Sequência de primers utilizados para análise de expressão gênica em rim de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias.

Gene	Sequência de oligo (5´-3´) (Primers)	Pares de base (bp)	Genebank número de acesso
þ-actin	F: CCACACAGTGCCCATACTACGA R: CCACGCTCTGTCAGGATCTTCA	144 bp	XM_003443127.4
sod2	F: GGTGCCCTGGAGCCCTA R:ATGCGAAGTCTTCCACTGTC	198 bp	XM_003449940.5
cat1	F:TCCTGAATGAGGAGGAGCGA R: ATCTTAGATGAGGCGGTGATG	232 bp	XM_003447521.5
Gpx	F:CCAAGAGAACTGCAAGAGA R: CAGGACACGTCATTCCTACAC	225 bp	NM_001279711.1
IL-1β	F: TGCACTGTCACTGACAGCCAA R: ATGTTCAGGTGCACTTTGCGG	113 bp	XM_01936581.2
IL-8	F: GCACTGCCGCTGCATTAAG R: GCAGTGGGAGTTGGGAAGAA	85 bp	XM_019359413.2

2.2.8 Análise Estatística

Após a tabulação dos dados, os resultados foram submetidos a análise de normalidade e hocedestacidade das variâncias em seguida a análise de variância (ANOVA). Quando verificada diferença estatística, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de significância para comparação de média através do programa estatístico SAS, versão 9.0.

Os resultados de expressão gênica foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerado uma forma ajustada para analisar as mudanças relativas de expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Desempenho Zootécnico

Os resultados observados no desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus)* alimentadas durante 30 dias com as dietas contendo diferentes níveis de Aquate Fish FT estão apresentados na Tabela 4. Não foram observadas diferenças (p>0,05) entre os tratamentos nos parâmetros de desempenho produtivo no período analisado.

Tabela 4 - Médias dos parâmetros zootécnicos: peso final (PF), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), consumo, conversão alimentar (CA), taxa de eficiência proteica (TEP) e índice hepatossomático (IHS) de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias

Variáveis	**Aquate Fish FT**				Valor de P
	0%	0,4%	0,8%	1,2%	
PF (g)	178,6 ± 2,0	171,1 ± 2,1	175,3 ± 2,1	171,3 ± 4,8	0,2967
GP (g)	114,4 ± 1,1	108,4 ± 2,7	110,6 ± 3,0	109,3 ± 4,5	0,5676
TCE (%)	2,6 ± 0,0	2,6 ± 0,0	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,01	0,8720
Consumo (g/peixe)	149,1 ± 4,9	137,4 ± 4,5	148,4 ± 9,3	142,8 ± 8,3	0,6286
CA (g)	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	0,7163
TEP (%)	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,0	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,0	0,1541
IHS (%)	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,2245

Os valores são médios ± EP (n = 4).

2.3.2 Parâmetros Imunológicos

Os parâmetros de respostas imunológicas dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus)* alimentados com Aquate Fish FT durante 30 dias estão apresentados na Tabela 5. Na atividade respiratória dos leucócitos foi encontrado diferença (p<0,05) entre os níveis de inclusão do Aquate Fish FT aos 30 dias de experimento, sendo observado menor atividade nos peixes do grupo controle quando comparados com os animais dos tratamentos com 0,8% e 1,2% de Aquate Fish FT. Na concentração de globulinas totais não foram observadas diferenças (p>0,05) entre níveis de inclusão do Aquate Fish FT avaliados.

Tabela 5 - Médias dos parâmetros imunológicos de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias.

Variáveis	**Aquate Fish FT**				Valor de P
	0%	0,4%	0,8%	1,2%	
Burst (DO)	0,22 ± 0,07b	0,40 ± 0,02 ab	0,42 ± 0,03 a	0,42 ± 0,01a	0,0304
Globulina (g/dL)	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,7 ± 0,3	2,4 ± 0,1	0,1377

Os valores são médias ± EP (n =4). Burst: atividade respiratória de leucócitos.

Na Tabela 6 estão apresentados os parâmetros hematológicos dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus)* alimentados com Aquate Fish FT durante 30 dias. Nos parâmetros hematológicos: hematócritos, número de eritrócitos, leucócitos, trombócitos, eritoblastos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, CGE e basófilos não foram observadas diferenças (p>0,05) para os níveis de inclusão do Aquate Fish FT avaliados.

Tabela 6 - Médias dos parâmetros hematológicos: hematócrito, eritrócitos, leucócitos, trombócitos, eritoblastos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, CGE e basófilos de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias.

Variáveis	**Aquate Fish FT**				Valor de P
	0%	0,4%	0,8%	1,2%	
Hematócrito (%)	31,44 ± 0,84	32,19 ± 1,06	32,87 ± 1,26	32,69 ± 1,46	0,8278
Eritrócitos ($x10^6$ mm^{-3})	1,94 ± 0,05	1,88 ± 0,07	2,21 ± 0,08	2,19 ± 0,17	0,0984
Leucócitos (μL^{-1})	572201 ± 43729	495873 ± 68810	600398 ± 30827	518190 ± 136251	0,7877
Trombócitos (µ/L)	193162 ± 8999	17946 ± 21654	214843 ± 334092	184716 ± 20768	0,7197
Eritoblastos (µ/L)	109622 ± 16648	99109 ± 26999	164583 ± 32053	123957 ± 38040	0,4485
Linfócitos (µ/L)	202024 ± 15244	189466 ± 29256	202374 ± 3299	213281 ± 47784	0,9514
Neutrófilos (µ/L)	138989 ± 17859	112903 ± 19826	142147 ± 5312	119346 ± 30077	0,6859
Monócitos (µ/L)	92808 ± 7261	81351 ± 16008	102244 ± 7221	77340 ± 24122	0,6629
Eosinófilos (µ/L)	77853 ± 16999	72105 ± 18009	60895 ± 6303	65701 ± 24853	0,9128
CGE (µ/L)	48369 ± 4846	36259 ± 7660	36625 ± 5619	28799 ± 15396	0,5454
Basófilos (µ/L)	13490 ± 616	8784 ± 1649	16590 ± 8047	10589 ± 1964	0,8308

Os valores são médias ± EP (n = 4).

As atividades hepáticas das enzimas do sistema antioxidante dos peixes que receberam as dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 7. A inclusão de Aquate Fish FT não resultou em diferenças (p>0,05) na atividade hepática da catalase e glutationa peroxidase. Na atividade hepática da superóxido dismutase foi observada maior atividade hepática (p<0,05) nos peixes que receberam a dieta com a inclusão de 0,8%, quando comparada com a dieta controle.

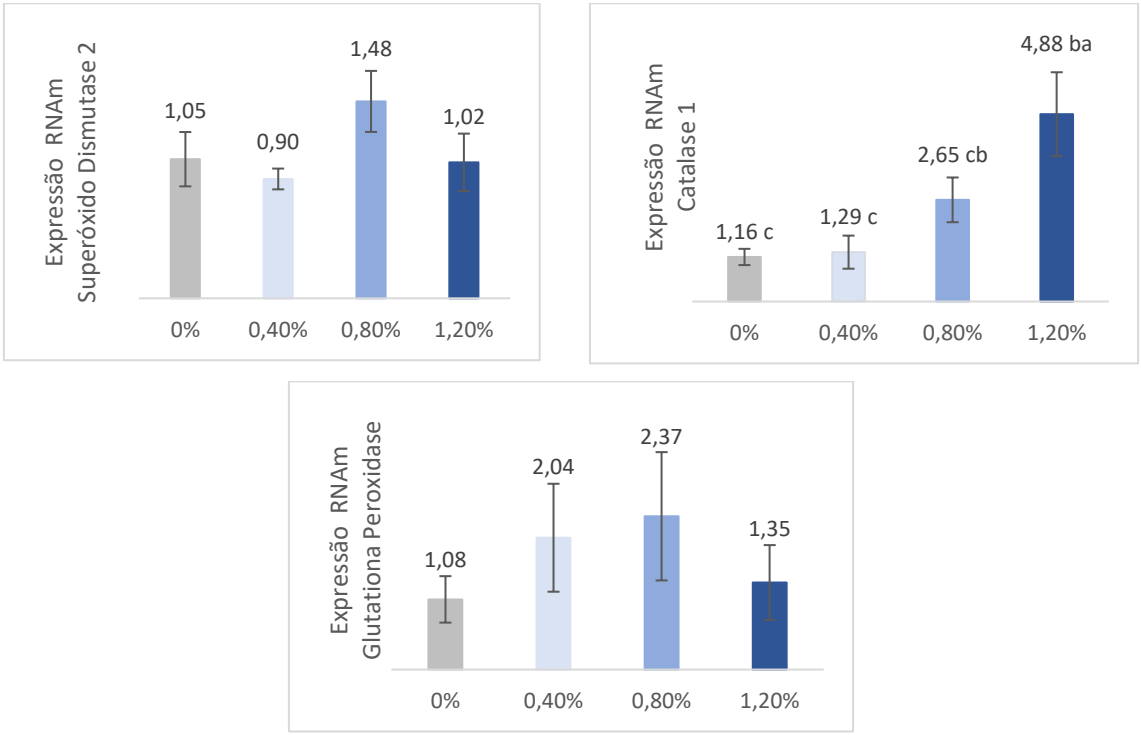
Tabela 7 - Médias das atividades hepáticas das enzimas do sistema antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias.

	Aquate Fish FT				**Valor de P**
Variáveis	0%	0,40%	0,80%	1,20%	
SOD (U SOD mg/proteína)	68,0 ± 0,6 b	79,6 ± 1,5 ab	103,7 ± 12,0 a	90,7 ± 3,7 ab	0,0214
CAT (U mg/proteína)	46,1,8 ± 2,8	59,8 ± 5,3	63,9 ± 6,5	60,5 ± 5,5	0,1551
GPx (mU mg/proteína)	393,0 ± 30,9	449,1 ± 43,6	490,4 ±1.88	497,3 ± 34,1	0,1561

Os valores são médias ± EP (n = 4).

As análises de expressão gênica relativa do rim cranial dos peixes alimentados com as dietas experimentais revelaram diferenças na expressão da catalase (*cat1*) nos peixes que receberam a dieta com 1,2% em comparação aos grupos controle e 0,4% de inclusão de Aquate Fish FT. Não foi observado diferença (p>0,05) nos níveis da expressão dos genes superóxido dismutase (*sod2)* e glutationa peroxidase (*gpx)* entre os níveis de inclusão do Aquate Fish FT avaliados (Figura 1).

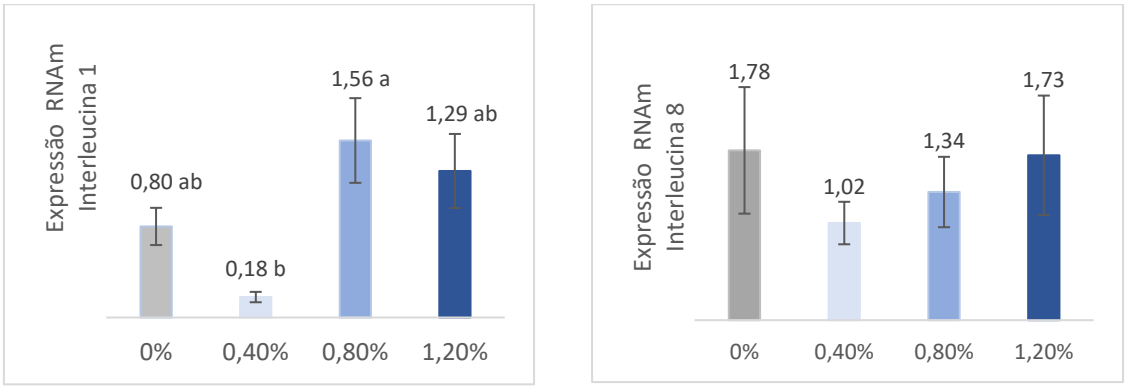
Figura 1 - Efeito na expressão relativa do RNAm dos genes *sod 2, cat 1 e gpx* de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 30 dias.



Os valores são médios ± EP (n = 4).

Em relação a citocinas do sistema imunológico, os peixes que receberam a dieta com 0,8% apresentaram maior expressão da *IL1β* em relação aos da dieta com 0,4% Aquate Fish FT. Não houve diferença significativa para a expressão da *IL8* (Figura 2).

Figura 2 - Efeito na expressão gênica dos genes *IL1β e IL8.*



Os valores são médios ± EP (n = 4).

2.4 DISCUSSÃO

Com a tendência de redução no uso de antibióticos, faz se necessário o uso de ferramentas que diminuam os potenciais prejuízos decorrentes da queda da imunidade, assim como o entendimento do modo de ação específico dos diferentes aditivos e a melhor forma de aplicação, considerando principalmente as possíveis combinações de produtos e os resultados esperados de acordo com a fase de produção (KYLE NEWMAN, 2001). Para uma produção mais rentável, é preciso que as rações tenham um conceito baseado em princípios de nutrição e saúde com intuito de promover estratégias que amenizem os efeitos estressantes, aumentando a resistência imunológica dos peixes, e permitindo assim que os animais mantenham o equilíbrio orgânico.

A catalase tem função, basicamente, de realizar a decomposição do peróxido de hidrogênio, um cofator para a produção da catalase é o ferro, e fatores que podem influenciar na absorção deste mineral são as proporções do mineral na forma orgânica e inorgânica na ração, a quantidade ingerida e as condições no trato digestório (WATANABE et al., 1997). No presente estudo não houve diferenças significativas ($p>0,05$) para os valores de catalase.

Em juvenis de bagre amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) alimentados com doses crescentes de sulfato de zinco (17 a 20,8 mg de Zn/kg), foram encontrados maiores níveis hepáticos de superóxido dismutase, sugerindo que a suplementação de zinco na dieta pode influenciar na atividade antioxidante no animal (LUO et al., 2011). Neste experimento com dietas suplementadas com Aquate Fish FT que possuíam 0,0; 12,36; 24,72 e 37,08 mg de proteinato de zinco/kg, a atividade hepática da SOD nos animais alimentados com adição de 24,72 mg/kg foi superior, sugerindo ativação do sistema antioxidante enzimático, uma vez que a SOD é a primeira na sequência cronologica das enzimas antioxidantes.

O selênio faz parte da glutationina peroxidase, que protege as membranas e as células contra danos oxidativos deletérios (LALL, 2002; NRC, 2011). A exigência da garoupa (*Epinephelus* malabaricus) foi estimada em 0,77 mg de Se/kg utilizando o complexo selenometionina e apenas utilizando o crescimento e retenção de selênio como parâmetro, uma vez que a atividade da glutationa

peroxidase aumentou até este nível máximo de inclusão do micromineral (LIN et al., 2005).

Em estudo realizado com pacu (*Piaractus mesopotamicus)* com alimentação prolongada de ração suplementada com selênio (0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,8 mg/kg de selênio de ração) Takahashi et al. (2017) descreveram que o selênio aumentou a atividade hepática da glutationa peroxidase e o número de leucócitos, mesmo na ausência de estimulação antigênica, demonstrando que selênio tem ação protetora no organismo. As diferentes dosagens do Aquate Fish FT (contendo 0,0; 0,48; 0,96; 1,44 mg Se/kg da ração) não resultou em diferença ($p>0,05$) na atividade hepática da glutationa peroxidase, mas foi observada uma tendência de maior atividade da enzima conforme se elevou a dose do Aquate Fish FT na dieta.

Ao avaliar a alteração gênica sobre a inclusão de nutrientes na dieta, é importante se atentar para alguns pontos: a resposta encontrada na expressão gênica pode ter discordância entre o nível de expressão genética e a expressão (produção) da proteica analisada, já que existe numerosos genes parálagos (que divergem dentro da espécie) em peixes. Muitos estudos, não apenas em peixes, mas também em outros sistemas biológicos, mostram uma discordância entre os níveis de expressão genética medidos e a concentração de compostos proteicos correlacionados encontrado, por exemplo, as atividades enzimáticas correspondentes (PANSERAT; KAUSHIK 2010).

A suplementação dietética pode ser um método eficaz para melhorar a capacidade antioxidante de um órgão ou tecido (WU et al., 2017). Proteínas relacionadas à produção dessas enzimas são codificadas por genes que possuem o nome similar a proteína final (enzima), como superóxido dismutase (*sod*), catalase (*cat*), glutationa peroxidase (*gpx*) e glutationa redutase (*gsr)*, *gpx1* tem três isoformas que foram identificados (*gpx1, gpx2 b1 e gpx b2*) (PACITI et al., 2013).

Nos juvenis de tilápia do presente experimento, a administração zinco não resultou em diferenças na atividade hepática da catalase, mas a sua expressão gênica foi maior no tratamento de 1,2% de Aquate Fish FT comparado com o controle 0 e 0,4%. A regulação da expressão da catalase ocorre por diversas vias diferentes, e a suplementação mineral pode ativar várias destas vias (GLORIEUX et al., 2015).

Embora os juvenis de tilápia alimentados com Aquate Fish FT tenham apresentado maior atividade enzimática da enzima superóxido dismutase, não houve diferença significativa na expressão gênica. Esta enzima possui diferentes isoformas *sod1*, *sod2* e sua atividade depende de minerais específicos e da sua disponibilidade. A expressão da isoforma avaliada foi a *sod2* pode não ser regulada da mesma maneira que a catalase, e independente da alta ou baixa disponibilidade destes minerais a expressão pode não sofrer alterações (VELASQUES et al., 2016)

Avaliações em peixes e mamíferos relatam que o zinco orgânico apresenta melhor capacidade de regular a expressão de *sod* em comparação com as formas inorgânicas (DOMINGUEZ et al., 2019; GUO et al., 2020; LIANG et al., 2020). A abundância de *sod1* diminuiu na truta truta arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) consumindo uma dieta deficiente de zinco (HIDALGO et al., 2002), diferente no observado no presente estudo onde o zinco não apresentou alteração na expressão da *sod*.

Em dourada (*Sparus aurata*) foi observado que com o aumento de selênio na dieta de 0,8 para 1,3 mg/kg a expressão hepática de *gpx* não foi alterada (MECHLAOUI et al., 2019). Resultado semelhante foi observado com a mesma espécie e órgão utilizando 0,45 a 1,7 mg NaSe/Kg (DOMINGUEZ et al., 2017). Nesta avaliação, assim como nos trabalhos citados acima, não foi possível observar maior expressão no gene *gpx* com maior inclusão de selênio orgânico. O selênio também apresentou função na ativação de genes relacionados a imunidade ao elevar a expressão de *IL1β* de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com 0,1 mg de nano Se/kg em comparação com o controle que continha mineral inorgânico (DAWOOD et al., 2020).

Similar ao encontrado por Devi et al. (2019) em rohu (*Labeo rohita)* com o uso de 1 g de MOS/kg a inclusão do Aquate Fish FT na dieta apresentou efeito na atividade antioxidante com maior expressão do gene catalase (*cat*) no rim cranial de peixes que receberam dieta com 1,2% quando comparada com as dietas controle e 0,4%.

Geralmente a expressão os genes *IL1*β e *IL8* são considerados indicadores de pró inflamatórios, com regulação da produção por secreção de outras citocinas (DEVI et al., 2019). Em relação a expressão das citocinas avaliadas neste estudo, houve diferença na expressão da *IL1β* no tratamento

0,8% em relação ao grupo alimentado com 0,4%, mas não houve diferenças significativas na expressão da *IL8* em nenhum dos tratamentos.

Os prebióticos são conhecidos por serem ingredientes não digeridos na porção proximal do trato gastrointestinal de monogástricos e benéficos ao hospedeiro por estimular, seletivamente, o crescimento e atividade de microrganismos potencialmente patógenos, proporcionando um ambiente saudável no intestino (ORTUÑO et al., 2002). A administração de prebióticos proporcionou aumento na ação antioxidante da célula, ativação de genes pró e anti-inflamatórios avaliados no rim, elevação da imunidade inata e adquirida, melhora crescimento e digestibilidade de alimentos com aumento na saúde e menor mortalidade em rohu (*Labeo rohita)* alimentados com 1 g/kg de MOS (DEVI et al., 2019).

O MOS está relacionado com a alteração positiva na produção de anticorpos, atividade bacteriolítica, atividade de lisozima e atividade respiratória de leucócitos em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss)* (STAYKOV et al., 2007), carpa comum (*Cyprinus carpio*) (STAYKOV et al., 2005), european bass (*Dicentrarchus labrax)* (TORRECILLAS et al., 2007), red drum (*Sciaenops ocellatus)* (ZHOU et al., 2010) e rohu (*Labeo rohita)* (ANDREWS et al., 2009).

A atividade respiratória dos leucócitos ou “burst oxidativo” dos leucócitos é a capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio que irão atuar para destruir agentes invasores, sendo uma resposta antimicrobiana das células fagocíticas, podendo em condições de estresse, ativar esses mecanismos de defesa (BILLER; TAKAHASHI, 2018). A alimentação para red drum (*Sciaenops ocellatus*) por 60 dias, com quatro prebióticos diferentes, não afetou significativamente a atividade respiratória dos leucócitos no grupo alimentado com dieta suplementada com 1,0 g/kg e MOS (ZHOU et al., 2010). Em similaridade a esta pesquisa, indicando maior preparo imunológico dos animais alimentados com o MOS, foi relatada maior atividade respiratória de leucócitos em rohu (*Labeo rohita*) alimentados por 60 dias com dieta contendo 1,0 g/kg de MOS (ANDREWS et al., 2009).

Este estudo demonstrou menor atividade respiratória de leucócitos nos peixes que receberam a dieta controle (0% de Aquate Fish FT), quando comparadas com as dietas que incluíram 0,8 e 1,2% de Aquate Fish FT, onde

em sua constituição se encontra as concentrações de 0,48 e 0,72 g/kg de MOS. Entretanto, a comparação de dosagens de MOS com outras fontes não é recomendada pois existem mananos modificados que possuem uma estrutura unica de MOS, não compartilhando com seus paralelos (KYLE NEWMAN, 2001).

Uma das ferramentas utilizada para avaliação do estado de saúde do animal é a hematologia, e esta pode resultar em alterações de acordo com a dieta ofertada (RANZANI-PAIVA; SILVA, 2004). Porém, semelhante ao avaliado neste estudo, com juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SADO et al., 2008; TAVARES DIAS; MORAES, 2004; HISANO et al., 2007), e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (WELKER et al., 2007) também não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nos valores hematológicos do grupo controle e do que recebeu MOS.

A suplementação da dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus)* com 2 g/kg de MOS por dois meses, resultou em contagem de eritrócitos significativamente maior em relação à dieta controle (ABU-ELALA et al., 2013). Em avaliação com juvenis de carpa comum (*Cyprinus carpio*) utilizando dietas contendo diferentes níveis de MOS (0,0, 1,0, 2,0 e 3,0 g/kg), foi constatado aumento, após 45 dias de alimentação, do hematócrito e eritrócitos no grupo alimentado com 1,0 g/kg MOS (AKRAMI et al., 2012). Apesar deste efeito apresentado nos trabalhos citados acima, no presente trabalho, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nos valores de hematócritos e eritrócitos para as diferentes dosagens de Aquate Fish FT, nas concentrações de 0,0; 0,24; 0,48 e 0,72 g MOS /kg.

Fontes quelatadas ou orgânicas de minerais têm sido utilizadas visando a melhoria da resposta imune. Particularmente, elementos traços estão relacionados a células mediadoras da imunidade humoral e da resposta imune não específica (MARCOS et al., 2003). Para que haja produção de eritrócitos, por exemplo, é necessário que exista suprimento adequado de minerais como ferro, cobre e cobalto e do fator hematopoiético responsável pela maturação normal e adequada das células (COLES, 1984). Uma suplementação carente de minerais determina valores sanguíneos de parâmetros imunológicos considerados abaixo do referencial para peixes sadios (FELDMAN et al., 2000).

Outros estudos são necessários, para examinar outros genes e em diferentes órgãos, a fim de elucidar os mecanismos de ações de minerais e

prebiótico. Além disso, os potenciais efeitos positivos deste suplemento na saúde dos peixes devem ser avaliados desafiando os animais por infecções bacterianas ou outros estressores.

2.5 CONCLUSÃO

O Aquate Fish FT não afetou negativamente o desempnho dos animais, como possui microminerais e mananoligossacarídeos que auxiliam na manutenção da saúde animal, a energia gasta para modular a imunadade permiti que menor perda decorrente dos estresses de produção. A inclusão do blend na dieta de tilápias afetou parâmetros imunológicos dos peixes, como a atividade respiratória de leucócito e a expressão do gene *IL1β*. Potenciais danos celulares foram controlados pela ativação do sistema antioxidante enzimático, ação demonstrada pela atividade da enzima superóxido dismutase e expressão do gene cat1. A inclusão do Aquate Fish FT sugere um melhor estado e preparo dos peixes para potenciais desafios nutricionais e ou ambientais, sem prejuízos no crescimento dos animais suplementados.

2.6 REFERENCIAS

ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, p. 21-29, 2013.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126,1984.

ANDREWS, D. M., JIN, L., BRANTLEY, S. L. AND LIN, H. Influences of catchment topography on carbon and dissolved metal concentrations in the Shale Hills Critical Zone Observatory. *SSSA* Annual Meeting*,* 2009.

AKRAMI, R.; RAZEGHI-MANSOUR, M.; CHITSAZ, H.; ZIAEE, R.; AHMADI, Z. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide on Growth Performance, Survival, Body Composition and Some Hematological Parameters of Carp Juvenile (*Cyprinus Carpio*). **Journal of Animal Science Advances**, v. 2, n. 11, p. 879-885, 2012.

BILLER, J. D.; TAKAHASHI, L. S. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. Anais da **Academia Brasileira de Ciências,** v. 90, p. 3403-3414, 2018.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.) **Biochemical Toxicology,** Oxford, IRL Press, p. 217-254, 1987.

COSTA, L. B.; TSE, M. L. P.; MIYADA, V.S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 589-595, 2007.

COLES, E.H. Patologia Clínica Veterinária. 3. ed. São Paulo: Manole, p. 566, 1984.

DAWOOD, M. A. O.; ZOMMARA, M.; EWEEDAH, N. M.; HELAL, A. I. Synergistic effects of selenium nanoparticles and vitamin E on growth, immune related gene expression, and regulation of antioxidant status of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) **Biological Trace Element Research**, v. 195, p. 624-635, 2020.

DEVI G.; HARIKRISHNAN, R.; PARAY, B. A.; AL SADOON M. K.; HOSEINIFAR, S. H.; ALASUNDARAM, C. Effects of symbiotic supplemented diet on innate adaptative immune response, cytokine gene regulation and antioxidant property in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shelgish Immunology**, v. 89, p. 687-700, 2019.

DOMINGUEZ, D.; ROBAINA, I.; ZAMOVANO, M. J.; KARALAZOS, V.; IZQUIERDO, M. Effects of zinc and manganese sources on giltheread seabream (*Sparus aurata*) fingerlings. **Aquaculture,** v. 505, p. 386-392, 2019.

DOMÍNGUEZ, D.; RIMOLDI, S.; ROBAINA, L. E.; TORRECILLAS, S.; TEROVA, G.; ZAMORANO, M.J.; KARALAZOS, V., HAMRE, K., IZQUIERDO, M. Inorganic, organic, and encapsulated minerals in vegetable meal based diets for *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) **PeerJ**., 2017.

FAO - **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. [S.l.]: FAO, 2020.

FELDMAN D. M., ZINKM J. G.; JAIN N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Donna Balado, Philadelphia, 2000.

FURUYA, W. M. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias.** Toledo: GFM, p. 79-82, 2010.

GLORIEUX, C.; ZAMOCKY, M.; SANDOVA, J. M.; VERRAX, J.; CALDERON, P. B. Regulation of catalase expression in healthy and Cancer cells. **Free radical biology e medicine.** Atlanta, 2015.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GUO, J.; HE, L.; LI T.; YIN J.; YIN, Y.; GUAN, G. P. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Different Zinc Sources on Diquat-Induced Oxidant Stress in a Piglet. **Model BioMed Research International,** 2020.

HIDALGO, M. C.; EXPOSITO, A. PALMA, J. M.; DE LA HIGUERA, M. Oxidative stress generated by dietary Zn deficiency; studies in raibow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,** v. 34, p. 183-193, 2020.

HISANO, H.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Levedura e zinco como pró nutrientes em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): Aspectos hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 1, p. 35-42, 2007.

KLEIN, J. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. **Immunology.** p. 311-334, 1990.

KYLE NEWMAN. Bio-Mos: **Opportunities for Improving Health and Production.** Venture Laboratories, Inc. 2001

KUBTIZA, F.; KUBTIZA, L. M. M. **Qualidade da água no cultuvo de peixes**, 1º Ed. Jundiaí –, SP; 2013.

LALL, S.P., The Minerals. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. Fish **Nutrition Third Edition Washingtown**: Academic Press, p. 260-300, 2002.

LIANG, X. F.; CAO, C.Y.; CHEN, P.; BRARADWA, J. A. S.; WU, X.F.; GU X.; RAO, Q. Y.; XUE, M. Effects of dietary zinc sources and levels on growth performance, tissue zinc retention and antioxidant response of juvenile common carp (*Cyprimus carpio var. Jian*) fed diets containing phytic acid. **Aquaculture Nutrition,** v. 26, p. 410-421, 2020.

LIN, Y. H., SHIAU, S. Y; Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v. 250, p. 356-363, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- **Time Quantitative PCR and the 2 Method** v. 408, p. 402–408, 2001.

LUO, Z.; TAN, X. Y.; ZHENG, J.L.; CHEN, Q. L.; LIU, C.X. Quantitive dietary zinc requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, and effects on hepatic intermediary metabolism and antioxidant responses. **Aquaculture,** v. 319, p.150-155, 2011.

MARCOS, A.; NOVA, A.; MONTERO, A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, Suppl.1, p. 66-69, 2003.

MECHLAOUI, M.; DOMÍNGUEZ, D.; ROBAINA, L.; GERAERT, P. A.; KAUSHIK, S.; SALEH, R.; IZQUIERDO, M. Effects of different dietary selenium sources on growth performance, liver and muscle composition, antioxidant status, stress response and expression of related genes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v.507, p. 251-259, 2019.

MING, W.; RUI, L.; LIPING, T.; HUANG, H.; WEIYI, L.; JIAN, L.; CHAO, L.; AIYING, L.; HONGLIN, L. Wanwen, Sequence and evolution differences of *Oreochromis niloticus* CXC contribute to the diversification of cellular immune responses in Tilapias with treatment of *Streptococcus iniae*, **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 12, p. 3, 2013.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A.; A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science,** v. 31, p. 735-738, 1952.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washington: National Academic Press; p. 164-184, 2011.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Oral admistration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae,* enhances the cellular innate immune responses of gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.85, p.41-50, 2002.

PACITI, D.; WANG, T.; PAGE, M.M.; MARTIN, S. A. M.; SWEETMAN, J.; FELDMANN, J.; SECOMBES, C. J. Characterization of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipis hydroperoxide glutathione peroxidase genes in raibow trout (*Oncorhjnchus mykiss*) and their modulation by in vitro selenium exposure. **Aquaculture Toxicology**, v. 130-132, p. 97-111, 2013.

PANSERAT, S.; KAUSHIK, S. K. Regulation of gene expression by nutritional factors in Fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 751-762, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; HIDALGO, M. C.; MORALES, A. E.; ARIZCUN, M.; ABELLÁN, E.; CARDENETE, G. Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex* fed on different dietary macronutrient levels. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology,** v. 150, p. 537-545, 2009.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA, A. T. S. Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds.) **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editor a Varela, 2004.

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 Butantã**, v. 20, p. 329-334, 1947.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. 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**, v. 39, n. 6, 2008.

SHAHIN, K.; SHINN, A. P.; METSELAAR, M.; RAMIREZ-PAREDES, J. G.; MONAGHAN, S. J.; THOMPSON, K.D.; HOARE, R., ADAMS, A. Efficacy of an

inactivated whole-cell injection vaccine for nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, against multiple isolates of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from diverse geographical regions. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, p. 217-227, 2019.

STAYKOV, Y.; DENEV, S.; SPRING, P. Influence of dietary mannan oligosaccharide (Bio-MOS) one growth rate and immune of common carp (*Cyprinus carpio L*.). In: HOWELL, B.; FLOS, R. (Eds.) Lessons from the past to optimize the future. Tronheim, Norway: **European Aquaculture Society**, p. 431-432, 2005.

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 15, p. 153-161, 2007.

TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp – A training manual. The essential nutrients. **FAO**, p. 117, 1990.

TAKAHASHI, L.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D.; MANSANO, C.F.M.; URBINATI, E.C.; GIMBO, R.Y.; SAITA, M.V. Long-term organic selenium supplementation overcomes the tradeoff between immune and antioxidant systems in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.60, p. 311-317, 2017.

TAVARES DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: M., TAVARES- DIAS, p. 144, 2004.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M.J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M. S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish Shellfish Immunolog**, v. 23, p. 969-981, 2007.

VELASQUES, R. R., SANDRINI, J. Z., ROSA, C.E. Roundup in Zebrafish: Effects on oxidative satatus and gene expression. **Mary Ann Liebert, Inc**. 2016.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151, p. 185-207,1997.

WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. 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**, v. 38, p. 24-35, 2007.

XIE, W.; ZHOU, L.; TIAN, J. NIU, Y.; LIU, Effect of N-acetyl cysteine and glycine supplementation on growth performance, glutathione synthesis, anti-oxidative and immune ability of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, **Fish Shellfish Immunology,** v. 55, p. 233-24, 2016.

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

CAPÍTULO III

EFEITOS DO AQUATE FISH FT EM DIETAS PARA TILÁPIAS DO NILO DESAFIADAS COM LPS: CRESCIMENTO, RESPOSTAS IMUNES E ENZIMAS ANTIOXIDANTES.

RESUMO – O metabolismo que envolve a resposta imunológica possui custo energético e eleva a produção de espécies reativas de oxigênio. O sistema antioxidante protege os tecidos de danos excessivos causados pelas respostas imunes, por isso a utilização de tecnologias nutricionais é relevante na produção animal, visto que essas podem modular a imunidade e auxiliar para maior atividade do sistema antioxidante. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição de 0; 0,4; 0,8 e 1,2% de Aquate Fish FT na dieta sobre as respostas imunológicas e fisiológicas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após desafio com lipopolissacarídeos (LPS). Foram utilizados 128 juvenis de tilápia (8 animais/caixa) com peso médio de 238,0 ± 19,9 g. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos em esquema fatorial 4x2, correspondendo aos 4 níveis de Aquate Fish FT (0; 0,4; 0,8 e 1,20%) e 2 coletas (antes e depois administração do LPS) com 4 repetições em cada tratamento. Após os 60 dias de alimentação com as dietas experimentais, foi realizada biometria (8 peixes/caixa) e coleta de fígado e sangue de dois animais/caixa. O restante dos peixes foi desafiado com injeção intraperitoneal da LPS (500 µg/kg PV). Após 24 horas da inoculação foram coletadas amostras de fígado e sangue de dois animais por caixa. Foram avaliados parâmetros imunológicos, hematológicos e enzimas do sistema antioxidante celular. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). A suplementação da dieta com Aquate Fish FT resultou em efeitos positivos sobre os parâmetros imunes, sendo observado maior atividade de lisozima e concentração de globulinas nos peixes que receberam a dieta com 1,2%, e maior atividade hepática da catalase na dieta com 0,8%. O hematócrito na dieta não apresentou diferenças entre os níveis de 0,4; 0,8 e 1,20% de Aquate Fish FT e a dieta controle com 0% do blend comercial.

Palavras-chave: aditivo, sistema imunológico, sistema antioxidante, lipopolissacarideos.

ABSTRACT - The metabolism that involves the immune response has an energy cost and increases the production of reactive oxygen species, The antioxidant system protects tissues from excessive damage caused by immune responses, so the use of nutritional technologies is relevant in animal production, since these can modulate immunity and aid for greater activity of the antioxidant system. objective of this study was to evaluate the effects of the addition of 0; 0,4; 0.8 and 1.2% of Aquate Fish FT in the diet on the immunological and physiological responses of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) after challenge with lipopolysaccharides (LPS). We used 128 tilapia juveniles (8 animals/box) with an average weight of 238.02 ± 19.96 g. The experiment was conducted in a completely randomized design with 8 treatments in a 4x2 factorial scheme, corresponding to the 4 levels of Aquate Fish FT (0; 0.4; 0.8 and 1.20%) and 2 collections (before and after LPS administration) with 4 replications in each treatment. After 60 days of feeding with the experimental diets, biometrics (8 fish/box) and liver and blood collection (two animals/box) were performed. The rest of the fish were challenged with intraperitoneal injection of endotoxin LPS (500 µg/kg BW). After 24 hours of inoculation, liver and blood samples were collected from two animals per box. Immunological, hematological and cellular antioxidant parameters were evaluated. The results were submitted to variance analysis (ANOVA) and the means compared by the Tukey test (5%). Supplementation of the diet with Aquate Fish FT resulted in positive effects on immune parameters, with higher lysozyme activity and globulin concentration in fish that received the diet with 1.2%, and higher hepatic catalase activity in the diet with 0.8%. Hematocrit and hemoglobin values in the diet showed no statistical differences within different dosages of 0.4; 0.8 and 1.20% of Aquate Fish FT and the control diet with 0% of the commercial blend.

Keywords: challenge, immuno, sanity, health.

3.1 INTRODUÇÃO

Para garantir a manutenção de funções vitais, os peixes devem consumir proteínas, minerais, carboidratos, vitaminas e lipídeos. Alguns nutrientes importantes são encontrados no ambiente através de alimentos naturais disponíveis, porém em sistemas intensivos é necessária a utilização de uma dieta balanceada para atingir o maior potencial de crescimento da espécie, em condições adequadas de saúde (WENDEMEYER, 1996).

O aumento da produção caracteriza-se por altas densidades de estocagem, submetendo os animais aos efeitos do estresse no cultivo que favorecem enfermidades infecciosas e parasitárias ocasionada pela imunossupressão. Uma vez que a infecção por estes patógenos se instala no organismo do peixe, muitos recursos são gastos na tentativa de eliminar o agente patogênico e evitar que ele acometa o restante do lote (VERSCHUERE et al., 2000).

O controle de infecções com antibióticos destrói parte da microflora intestinal, são potencialmente prejudiciais ao ambiente, além de promoverem a seleção de microrganismos resistentes, com a possibilidade de transferência de genes de resistência às bactérias nunca expostas ao antibiótico (VERSCHUERE et al., 2000). Nesse contexto, o ideal é que se trabalhe de forma profilática, mantendo o sistema imunológico do animal saudável de modo que ele possa combater agentes patogênicos e proporcionar um ambiente livre do uso destes medicamentos (HARIKRISHNAN et al., 2011).

Ingredientes funcionais aumentam a resistência a doenças infecciosas através do estímulo a imunidade. O uso destes nutracêuticos é um meio de aumentar a imunocompetência e resistência a doenças. Os imunomoduladores compreendem substâncias que adicionadas à dieta dos peixes beneficiam a resposta de defesa. Compreendem o grupo: vitaminas, agentes químicos, microminerais, componentes bacterianos, polissacarídeos, fatores nutricionais, citoquinas e produtos derivados de plantas e animais (SAKAI, 1999). Estas substâncias conseguem melhorar a resistência ao estresse e consequentemente às infecções de etiologias variadas devido ao incremento das respostas de defesa (VAL et al., 2006).

A inclusão de aditivos nutricionais nas dietas dos animais de produção é uma prática comum e observada globalmente, pois os aditivos têm se mostrado como uma ferramenta útil na prevenção de desordens intestinais, na melhora da saúde intestinal e na melhora das respostas de defesa dos animais. Prebióticos são ingredientes alimentares que não são digeridos na porção proximal do trato gastrintestinal de animais monogástricos e são benéficos ao hospedeiro por estimular, seletivamente, o crescimento e/ou atividade de um limitado número de microrganismos no cólon, os quais proporcionam um ambiente intestinal saudável. Derivados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com ação prebiótica, os mananoligossacarídeos (MOS) são empregados há tempos na alimentação animal, com diversos benefícios comprovados (KYLE NEWMAN, 2001).

Micronutrientes possuem função de auxiliar no sistema antioxidante e imunológico do organismo (HARDY, 2001). Em sua forma orgânica, os minerais têm maior biodisponibilidade, possibilitando melhora na absorção, respostas imunes e sustentabilidade do cultivo. Fontes mais protegidas de interações são mais aproveitadas pelos animais e raramente serão tóxicas, sendo então uma boa alternativa na suplementação deste organismo (APINES-AMAR et al., 2004).

Os lipopolissacarideos (LPS) vem sendo utilizados em estudos com peixes como fator de desafio para avaliar os efeitos de imunoestimulantes das dietas (HA et al., 2017; SOUZA et al., 2020). As respostas produzidas pelo LPS em peixes são similares às observadas em mamíferos, porém quantitativamente seus efeitos nocivos são menos intensos, demonstrando a resistência relativa dos peixes ao LPS (CONGLETON; WAGNER, 1991).

O experimento foi realizado para avaliar diferentes concentrações da administração Aquate Fish FT por 60 dias e determinar os efeitos no sistema imune não específico, parâmetros hematológicos e atividade de enzimas do sistema antioxidante de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) antes e após desafio com LPS.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos de manipulação dos animais foram submetidos à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Campus de Jaboticabal e estavam de acordo com os preceitos e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Certificado n°. 003556-CEUA).

3.2.1 Instalações e Qualidade de Água

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Tilapicultura do Centro de Aqüicultura (CAUNESP - Jaboticabal, SP, Brasil), da Unesp - Universidade Estadual Paulista. Cento e vinte e oito animais (peso = 238,02 ± 19,96 g) foram distribuídos em 16 tanques de polietileno (200 L) na densidade de oito peixes por caixa. O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos em esquema fatorial 4 (níveis de inclusão) x 2 (antes e depois do desafio com LPS) e quatro repetições por tratamento. Os animais desafiados já não se enquadram em juvenis.

Os tanques foram instalados em sistema fechado com recirculação de água, com renovação de aproximadamente dez vezes ao dia. A matéria orgânica depositada no fundo das caixas, durante todo o experimento e sempre que necessário, foi removida através de sifonamento com uma mangueira de borracha. Os tanques foram dotados de aeração e com sistema de escoamento de água diretamente do fundo, facilitando a saída de excretas e resíduos alimentares. Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água, mensurados semanalmente, permaneceram dentro do adequado para o desenvolvimento dos peixes: oxigênio dissolvido de 5,45 ± 0,66 mg/L e temperatura de 24,94 ± 0,29ºC (ProODO Optical Dissolved Oxygen Instrument, Yellow Springs, Ohio, USA), pH de 7,07 ± 0,08 (ProPlus Multiparameter Instument, Yellow Springs, Ohio, USA) e concentração da amônia total 13,6 ± 0,6 µg/L (Reagentes de Nessler) adequados para o ideal crescimento e desenvolvimento dos animais (KUBTIZA, 2013).

3.2.2 Dietas Experimentais e Protocolo Experimental

Foram formuladas quatro dietas práticas isoprotéicas (28% de proteína bruta) e isoenergéticas (4.000 kcal EB/kg) e que atenderam às exigências nutricionais da espécie segundo recomendações de Furuya et al. (2010). Foram avaliados quatro níveis de inclusão (0; 0,4; 0,8 e 1,2%) do Aquate Fish FT (Alltech, São Pedro do Ivaí, Brasil), blend de microminerais orgânicos e prebiótico conforme demonstrado na Tabela 1.

Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 60 dias até a saciedade aparente, em 2 refeições diárias (09h00m e 16h00m). Foi considerada saciedade aparente o momento em que os animais deixaram de consumir os peletes de ração, desta forma as rações foram fornecidas em pequenas porções durante alguns minutos, com cautela e observação do comportamento animal, para que não houvesse sobra de alimento. O consumo de ração foi medido diariamente por meio de pesagem dos recipientes de armazenagem da ração de cada caixa. Foram avaliados quatro níveis de inclusão (0; 0,4; 0,8 e 1,2%) do Aquate Fish FT (Alltech, São Pedro do Ivaí, Brasil) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição do Aquate Fish FT.

	Nível de garantia (mínimo)
Proteína	192 g/kg
Mananas	8400 mg/Kg
Zinco	20,6 g/Kg
Selênio	60 mg/kg
Cobre	26,6 mg/kg

Os ingredientes foram triturados em moinho de martelo (peneira de 0,8 mm) e misturados conforme a formulação das dietas experimentais (Tabela 2). A mistura foi extrusada com adição de água (30%) e levados à estufa à 45°C por 48 horas. As dietas foram armazenadas em potes plásticos e conservadas sob refrigeração (4°C) durante todo o experimento.

Tabela 2 - Formulação das Dietas Experimentais.

Ingredientes (%)	**Aquate Fish FT**			
	0,0%	0,4%	0,8%	1,2%
Milho Moído	28,0	28,0	28,0	28,0
Farelo de Soja	28,0	28,0	28,0	28,0
Farelo de Trigo	18,0	18,0	18,0	18,0
Farinha de Vísceras	11,3	11,3	11,3	11,3
Farinha de Carne	6,3	6,3	6,3	6,3
Farelo de Arroz Cru	5,0	5,0	5,0	5,0
Suplemento Vitámico e Mineral[1]	0,5	0,5	0,5	0,5
Antifúngico[2]	0,3	0,3	0,3	0,3
Fosfato Bicálcico	0,2	0,2	0,2	0,2
L-Lisina	0,2	0,2	0,2	0,2
DL-Metionina	0,2	0,2	0,2	0,2
Antioxidante[3]	0,01	0,01	0,01	0,01
Caulim	1,5	1,1	0,7	0,3
Aquate Fish FT[4]	0,0	0,4	0,8	1,2
Composição Estimada (% MS)				
Proteína Bruta, %	28,0	28,0	28,0	28,0
Proteína Digestíveis %	23,8	23,8	23,8	23,8
Extrato Etéreo, %	5,5	5,5	5,5	5,5
Fibra Bruta, %	4,3	4,3	4,3	4,3
Matéria Mineral, %	7,4	7,4	7,4	7,4
Energia Bruta kcal/kg	4000,0	4000,0	4000,0	4000,0

[1]Premix MCassab, níveis de garantia do produto: vitamina A, 500.000 UI; vitamina D3, 250.000 UI; vitamina E, 5.000 mg; vitamina K3, 500 mg; vitamina C, 10.000 mg; vitamina B1, 1.000 mg; vitamina B2, 1.000 mg; vitamina B6, 1.000 mg; vitamina B12, 2.000 mg; pantotenato de cálcico, 4.000 mg; niacina, 2.500 mg; ácido fólico, 500 mg; biotina, 10 mg; cloreto de colina, 100.000 mg; Cu, 1.000 mg; Fe, 5.000 mg; I, 200 mg; Co, 50 mg; inositol 1.000 mg; Mn, 5.000 mg; Se, 30 mg; Zn, 9.000 mg. [2]Mold-zap AS Alltech, ácido propiônico 350g/kg; sorbato de potássio 150g/kg; hidróxido de amônia 30g/kg. [3] Banox Alltech BHT 120g/kg; BHA 10g/kg. [4]Aquate Fish FT com níveis de garantia mínimos: zinco 20,6 g/kg; manganês 8400 mg/kg; selênio 60 mg/kg e cobre 26,6 mg/kg.

Após o período de alimentação experimental, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, anestesiados em solução de benzocaína (1 g/5 L de água), individualmente pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01 g, medidos em ictiômetro e distribuídos nas unidades experimentais. Aos 60 dias de experimento foram retirados dois animais de cada caixa, os animais

utilizados para coletas de sangue por meio de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 5 mL.

Foram utilizadas seringas sem anticoagulante para a obtenção de soro, que foi destinado à determinação da concentração de proteína total, albumina e cálculo da concentração de globulinas. Microtubos com anticoagulante (heparina) foram utilizados para armazenamento do sangue destinado à determinação da atividade respiratória de leucócitos e determinação do hematócrito. A separação das alíquotas do sangue foi realizada pela centrifugação (Allegra x-30R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA) logo após a coleta (10 minutos, 875 g, à 10ºC) para separação do plasma, e após uma hora à temperatura ambiente para separação do soro. Ambas foram armazenadas à -18ºC.

Com os peixes laparatomizados foi feita a retirada e pesagem do fígado para análise das enzimas do estresse oxidativo. As amostras de fígado foram envolvidas em papel alumínio previamente identificados e armazenadas em freezer a -80ºC até serem analisadas. Com peso se fez a relação somática de índice hepatossomático (IHS) de acordo com a fórmula: [100 x (peso do tecido/peso vivo)].

3.2.3 Desafio com Lipopolissacarídeos (LPS)

Após a biometria de 60 dias, os animais foram desafiados por meio de injeção intraperitoneal de 0,1 mL de LPS por grama de peixe (1000 µg/kg), extraída de *E. coli* 026:B6, (Sigma, St. Louis, USA). Neste período de desafio os animais deixaram de receber alimentação. Vinte e quatro horas após o desafio foi colhido sangue e fígado para posteriores análises, semelhantes as que foram realizadas antes do desafio.

3.2.4 Desempenho Zootécnico

Com os dados biométricos e de consumo de ração, foram calculados e avaliados os seguintes parâmetros de desempenho, segundo Tacon (1990).

- Peso Final (PF);

- Ganho em peso diário:

GP (g/dia) = (peso final – peso inicial) / período experimental;

- Taxa de crescimento específico:

TCE (%/dia) = 100 x [(ln peso final – ln peso inicial) / período experimental];

- Consumo alimentar diário:

CAD (g/dia) = alimento consumido / período experimental;

- Conversão alimentar aparente:

CA = alimento fornecido / ganho em peso total;

- Taxa de eficiência proteica:

TEP (%) = 100 x (ganho em peso total / proteína bruta consumida);

3.2.5 Parâmetros Imunológicos Avaliados

3.2.5.1 Atividade de Lisozima

A determinação da atividade da lisozima foi realizada segundo o método clássico de lisar uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus,* por ensaio turbidimétrico e medida pela redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (SMOLELIS; HARTSELL, 1949).

A redução da densidade óptica em 450 nm, foi avaliada entre 0 e 20 min à 30º C em espectrofotômetro de microplacas ASYS expert plus Elisa (BioChrom, Holliston, USA). Os resultados em unidade de atividade (U/mL) foram determinadas como a quantidade de enzima que produziu, em 450 nm, uma Δ DO de 0,001/min (WON et al., 2004).

3.2.5.2 Atividade Respiratória de Leucócitos

Para análise da atividade respiratória de leucócitos foi seguido o protocolo de Biller-Takahashi et al. (2013). O método consistiu na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante “*nitroblue tetrazolium*” (NBT) que formam precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1990). Para

a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total (com heparina) foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, USA).

Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, USA) e centrifugado a 3000 rpm por 5 min (Allegra x-30R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA). O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de *formazan* liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (Genesys 10S Spectrophotomete, Thermo Scientific, Waltham, USA).

3.2.5.3 Concentração Sérica de Globulinas

A concentração de proteína total foi determinada no soro pelo método do biureto (CAIN; SKILLETER, 1987) e a de albumina pelo método colorimétrico verde de bromocresol (Albumina Ref. 419, Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brasil). Com os resultados de albumina e proteína plasmática total foi determinada a quantidade de globulina plasmática por diferença.

3.2.5.4 Parâmetros Hematológicos

A partir das amostras de sangue total, procedeu-se a determinação do hematócrito pela técnica do microhematócrito e a concentração de hemoglobina, pelo método cianometahemoglobina (620529, Laborclin, Pinhais, Brasil). Amostras de sangue total foram introduzidas em capilares para microhematócrito, que foram centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm em centrífuga de microhematócrito. Em seguida, a avaliação foi realizada com o auxílio da tabela de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971).

3.2.6 Enzimas do Sistema Antioxidante

As amostras de fígado foram inicialmente descongeladas para preparação de um homogenato na concentração de 1 g de tecido para 4 mL de tampão de

homogeneização (Tris HCl 100 mM, EDTA 0,1 mM e triton x-100 0,1%, pH 7,8). O homogenato foi preparado em um homogeneizador tipo Potter (Modelo NT 136, Novatecnica, Piracicaba, Brasil) a 600 rpm por aproximadamente 3 minutos. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugados a 5000 rpm, por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4ºC) (Allegra X-30R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA).

Após centrifugação, os sobrenadantes foram separados em alíquotas para análise da atividade das enzimas do sistema antioxidante. No mesmo dia de preparo dos homogenatos, foi quantificada a concentração de proteína de cada amostra pelo método de Biureto (CAIN; SKILLETER, 1987) em espectrofotômetro a 540 nm (Genesys 10S Spectrophotomete, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade hepática da SOD (EC 1.15.1.1) foi medida pelo método do ferricitocromo C usando xantina / xantina oxidase como fonte de radicais superóxido. O coquetel de reação consistiu em tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 7,8), EDTA a 0,1 mM, xantina a 0,1 mM, citocromo C a 0,013 mM e xantina oxidase a 0,024 UI/mL. A atividade foi expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma inibição de 50% da taxa de redução do ferricitocromo C (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009). A atividade da SOD foi determinada pela absorbância de 550 nm, à 25ºC, em leitor de microplacas (Multiskan Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Catalase (CAT)

A atividade hepática da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada medindo a diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio pela absorbância a 240 nm de acordo com Aebi (1984). O coquetel de reação consistiu em H_2O_2 10,6 mM preparado no momento da utilização. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato por minuto sob as condições analíticas descritas. A atividade da CAT foi determinada

pela absorbância de 240 nm, à 25º C, em leitor de microplacas (Multiskan, Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Glutationa Peroxidase (GPx)

A atividade hepática da GPx (EC 1.11.1.9) foi medida seguindo o método de Pérez-Jiménez et al. (2009). A glutationa na forma oxidada (GSSG) gerada pela GPx foi reduzida pela glutationa redutase (GR) e a oxidação de NADPH foi monitorada pela absorbância a 340 nm. O coquetel de reação consistiu em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,1), 3,6 mM de glutationa reduzida (GSH), 3,6 mM de azida de sódio, 1 UI/mL de glutationa redutase, 0,2 mM de NADPH e 1,2 mM de H_2O_2. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um µmol por minuto, nas condições analíticas descritas. A atividade da GPx foi determinada pela absorbância de 340 nm, à 25ºC, em leitor de microplacas (Multiskan Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA).

3.2.7 Análise Estatística

Após a tabulação dos dados, os resultados foram submetidos a análise de variância e, quando verificada diferença estatística, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de significância para comparação de média através do programa estatístico SAS, versão 9.0.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Parâmetros Imunológicos

Os parâmetros imunológicos: atividade respiratória de leucócitos (burst), concentração de lisozima e concentração de globulinas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com Aquate Fish FT durante 60 dias, antes e depois do desafio com LPS, estão apresentados na Tabela 3. A atividade respiratória de leucócitos foi significativamente menor após o desafio com LPS ($p<0,05$), não apresentando diferenças ($p<0,05$) entre os diferentes níveis de inclusão do Aquate Fish FT. A concentração de lisozima sérica foi maior nos peixes que receberam a dieta com 1,2% de Aquate Fish FT, também sendo mais elevada após o desafio ($p<0,05$). A concentração de globulinas totais foi maior

($p<0,05$) nos animais que receberam a dieta com 1,2% do Aquate Fish FT, sem diferenças ($p>0,05$) entre a coleta antes e após o desafio com LPS.

Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros hematológicos dos animais alimentados com Aquate Fish FT durante 60 dias, antes e depois do desafio com LPS. No hematócrito foi observado efeito ($p<0,05$) na interação entre os níveis de Aquate Fish FT e desafio com o LPS. Os peixes alimentados com a dieta controle (0% de Aquate Fish FT) apresentaram menor hematócrito (Figura 1), mesmo sem considerar o desafio, os peixes que receberam a dieta controlem apresentaram menor hematócrito que os das dietas com Aquate Fish FT. A hemoglobina também foi menor ($p<0,05$) nos animais que receberam a dieta controle, mas sem diferença ($p>0,05$) em relação ao desafio com LPS.

As atividades hepáticas das enzimas do sistema antioxidante estão apresentadas na Tabela 5. Foi observada maior atividade hepática da catalase entre os níveis de Aquate Fish FT (inclusão de 0,8% com maior atividade) e após o desafio com LPS ($p<0,05$). Na atividade hepática da superóxido dismutase e da glutationa peroxidasse não foram observadas diferença ($p>0,05$) entre os níveis do Aquate Fish FT e o desafio com LPS (Tabela 5).

Tabela 3 - Médias da atividade respiratória de leucócitos (burst), concentração de lisozima sérica e concentração de globulina de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 60 dias, antes e depois do desafio com LPS.

	Aquate Fish FT				**Desafio com LPS**		**Two-way ANOVA**		
Variáveis	0%	0,40%	0,80%	1,20%	**Antes**	**Depois**	**Aquate (A)**	**Desafio (D)**	**A x D**
Burst (DO)	0,4±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0a	0,44±0,0b	0,1831	0,0129	0,6783
Lisozima (Uml -1)	1748,2±150,3b	2082,2±218,7ab	2319,4±142,6a	2640,5±95,6ª	2002,4±144,6b	2392,7±119,4a	0,0026	0,0127	0,5961
Globulina (d/L)	2,8±0,3b	4,0±0,3ab	3,6±0,1ab	4,1±0,3a	3,7±0,2ª	3,6±0,2a	0,0284	0,5539	0,3174

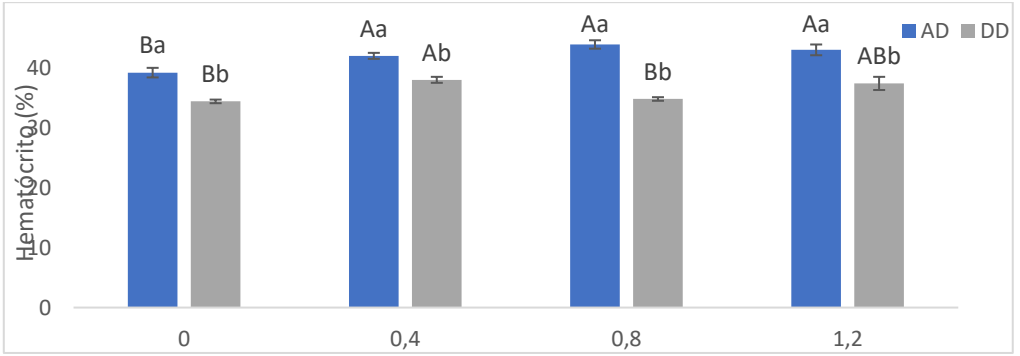
Os valores são médios ± EP (n = 4).

Tabela 4 - Médias de hematócrito e hemoglobina de tilápia do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 60 dias antes e depois do desafio com LPS.

	Aquate Fish FT				**Desafio com LPS**		**Two-way ANOVA**		
Variáveis	0%	0,40%	0,80%	1,20%	**Antes**	**Depois**	**Aquate (A)**	**Desafio (D)**	**A x D**
Hematócrito (%)	36,8±1,1b	40,0±1,0a	39,4±2,0a	40,2±1,4a	42,0±0,6ª	36,2±0,5b	0,0008	<0,0001	0,0133
Hemoglobina (g/dL)	10,8±0,4b	13,0±0,4a	13,2±0,5a	13,4±0,4a	13,0±0,4	12,2±0,4	0,0027	0,0773	0,7550

Os valores são médios ± EP (n = 4).

Figura 1 - Hematócrito de juvenis da tilápia do Nilo alimentadas por 60 dias com diferentes níveis de Aquate Fish FT antes e depois do desafio com LPS.



Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os níveis de inclusão do Aquate Fish FT pelo teste de Tukey (5%).
Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas após o desafio com LPS pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 5 - Médias da atividade hepática da catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase de tilápia do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT durante 60 dias, antes e depois do desafio com LPS.

	Aquate Fish FT				**Desafio com LPS**		**Two-way ANOVA**		
Variáveis	0%	0,40%	0,80%	1,20%	A	D	Aquate (A)	Desafio (D)	A x D
CAT (U mg/proteína)	58,8±7,1b	65,3±5,8ab	95,9±20,8a	77,6±6,4ab	56,8±4,3b	92,0±9,4a	0,0463	0,0012	0,3653
SOD (U SOD mg/proteína)	78,4±6,6	78,7±5,9	97,0±10,8	93,7±2,6	88,3±7,2	85,6±2,6	0,2244	0,7375	0,8085
GPx (mU mg/proteína)	650,6±34,0	823,8±52,3	951,1±149,0	883,5±51,7	878,9±81,8	775,6±40,2	0,1436	0,2642	0,8759

Os valores são médios ± EP (n = 4).

3.4 DISCUSSÃO

Uma boa saúde permite aos animais maior capacidade de resistir aos agentes patogênicos, sobretudo em sistemas intensivos de criação. Por isso, o balanceamento das rações deve promover a saúde animal, permitindo que apresentem defesas contra agentes causadores de doenças e, ao mesmo tempo, promover desenvolvimento máximo dos peixes. Desta forma, é possível mitigar os efeitos indesejáveis do estresse, muito comum em peixes mantidos em densidades de estocagem elevadas (KYLE NEWMAN, 2001).

Os mananoligossacarídeos são derivados da parede celular interna de leveduras e seu modo de ação consiste em se ligar a certas bactérias patogênicas no ambiente gastrointestinal, de forma que essas bactérias ligadas ao MOS, não possam se aderir à infecção iniciada no intestino e também auxiliam na preparação imune para combate a infecção (DE ARAUJO et al., 2007)

Um dos mecanismos mais importantes da defesa dos peixes é a fagocitose, onde células destroem partículas invasoras (NEUMANN et al., 2000). Durante a fagocitose de patógenos, leucócitos aumentam seu consumo de oxigênio através da NADPH oxidase e geram várias espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion radical superóxido (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio livre (O_2) e o radical hidroxila (OH^-) em um processo chamado atividade respiratória de leucócitos (burst oxidativo) (KLEBANOFF, 1999). O burst tem sido frequentemente utilizada como um indicador de imunidade inespecífica em peixes (SAHOO; MUKHERJEE, 2002; SAHOO et al., 2005)

Semelhante ao presente estudo, a alimentação para red drum (*Sciaenops ocellatus*), por 60 dias, com quatro prebióticos diferentes, não afetou significativamente a atividade respiratória de leucócitos no grupo alimentado com dieta suplementada com 1,0 g/kg MOS (ZHOU et al., 2010). Gimbo (2011) também não observou efeito dos níveis de selênio e/ou vitamina E para o número total de leucócitos e atividade respiratória de leucócitos. As diferentes inclusões do Aquate Fish FT, que contém mananoligossacarídeos e zinco, selênio e cobre orgânicos não resultou em alterações no burst oxidativo, porém a atividade respiratória dos leucócitos, após os peixes serem desafiados com LPS, foi menor independentemente dos tratamentos, indicando que esta resposta de defesa foi suprimida, para evitar a superprodução de radicais livres ou a maior ação do

sistema antioxidante conseguiu controlar a superprodução destes radicais livres. Ação que poderia ter como consequentemente o estresse oxidativo (BILLER-TAKAHASHI et al. 2015). Em surubins (*Pseuoplatysima sp*) alimentados com diferentes relações de proteína e carboidrato, e em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com MOS, foi obervado maior atividade respiratória de leucócitos (SOUZA et al., 2020; HA al, 2017).

Uma forma de se avaliar o estado nutricional e de saúde de peixes é por meio de análise das características hematológicas, pois o sangue é um dos tecidos mais dinâmicos do organismo e sofre alterações em função do tipo da dieta consumida (RANZINI PAIVA, 20014). Em carpa comum (*Cyprinus carpio*), não foram observadas diferenças significativas nos valores de hematócritos, eritrócitos e hemoglobina nos peixes alimentados com por 45 dias com 3 g/kg de MOS, quando comparados ao grupo controle sem o aditivo (VIADAMMA, 2012). Na alimentação de rohu (*Labeo rohita)* por 60 dias com MOS, foi obtido valores de hemoglobina e número de eritrócitos significantemente maiores nos peixes alimentados com dieta contendo 1,0 g/kg do prebiótico em relação aos alimentados com 2 e 4 g/kg de MOS (ANDREWS et al., 2009). Na avaliação do Aquate Fish FT, foram encontradas diferenças nos valores de hematócritos e hemoglobina, sendo observado na dieta controle menor valor ($p<0,05$) quando comparado as dietas com os crescentes níveis do Aquate Fish FT que corresponderam a 0,24; 0,48 e 0,72 mg/kg de MOS por kg da ração final.

Muitos trabalhos são realizados com o objetivo de estabelecer a exigência nutricional de diferentes minerais e vitaminas para espécies aquáticas cultivadas em aquicultura com base na menor quantidade necessária para que os animais tenham o melhor crescimento possível (NRC, 2011). Apesar dos microminerais serem exigidos em pequenas quantidades merecem também atenção especial quanto ao balanço entre ingestão, reserva e excreção, já que participam de diversas funções metabólicas vitais para adequada saúde dos animais. Além dos estudos que estabelecem as exigências nutricionais, muitos estudos têm se dedicado ao uso de minerais como aditivos nutricionais, a fim de melhorar os marcadores imunológicos dos animais (KYLE NEWMAN, 2001).

A lisozima é uma das respostas inatas mais estudadas em peixes (GLYNN, 1969; JOLLÉ; JOLLÉ, 1984), e a sua concentração ou atividade é um ótimo indicador da imunidade inata nestes organismos (SAURABH; SAHOO,

2008), sendo avaliada devido a sua importância contra a invasão microbiana. A importância dos níveis de lisozimas ou sua atividade na imunidade inata de peixes está bem documentada, devida a atividade lítica contra bactérias (LIE et al., 1989).

Em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Takahashi et al. (2017) demonstraram aumento da atividade da lisozima quando os peixes foram alimentados com 1,15 mg Se/kg. Saleh et al. (2014) mostraram que o selênio na concentração 1,07 mg/kg aumentou a atividade da lisozima no linguado (*Paralichthys olivaceus*). A concentração de 1,44 mg/kg de selênio presente no Aquate Fish FT apresentou maior atividade da lisozima quando comparado com a dieta controle e a inclusão de 0,8%, que contém 0 e 0,96 mg/kg de selênio, respectivamente.

O sistema imunológico dos peixes é capaz de reconhecer substâncias exógenas através de receptores existentes nas células de defesa, que identificam proteínas e moléculas específicas de micro-organismos. O LPS é conhecido por estimular estas proteínas, como a lisozima e as proteínas do sistema complemento, e algumas células como os linfócitos B e T, atuando diretamente nos parâmetros inatos de defesa. Em um estudo realizado com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), suplementadas com MOS e desafiado com LPS, foi observado que a atividade da lisozima foi influenciada pelo tempo de coleta após o desafio (HA et al., 2017). Nos juvenis de tilápia deste estudo a lisozima também foi influenciado pelo LPS, apresentando maior atividade após o desafio com LPS.

Flores Quintana (2002) testou a aplicação em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) doses crescentes de LPS: 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg/kg de PV e observou valor significativamente maior no hematócrito após o uso do LPS, diferente do observado neste experimento, onde foram encontrados valores menores ($p<0,05$) após o desafio com LPS. Devido às variações na estrutura do LPS, a sua potência e a extensão da indução de choque; afinidade de ligação de proteínas e outras atividades biológicas variam de espécie para espécie (CUNNINGHAM et al., 1996), justificando assim a não semelhança entre as respostas nos dois trabalhos. A taxa de hemoglobina não sofreu alteração significativa em seus valores após o desafio com lipopolissacarídeos na presente avaliação.

As proteínas totais do soro estão associadas à resposta inata e são compostas por albuminas e globulinas. O grupo globulina é subdividido em alfa, beta e gama, sendo a fração gama a principal fonte de toda a proteína imunologicamente ativa do sangue (ANDREWS et al., 2011; CHOUDHURY et al., 2005). Foi possível observar que a inclusão de maior suplementação de selênio 1,2 mg/kg de selênio proporcionou maior concentração de globulinas no soro de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (GIMBO, 2011).

Um experimento avaliando MOS na dieta para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus),* demonstrou aumento significativo nas proteínas totais séricas e globulinas dos peixes suplementados com 2 g de MOS/kg em relação à dieta basal (ABU-ELAL et al., 2013), indicado estímulo imunológico destes animais. Semelhante ao observado neste experimento, no qual a inclusão de 1,2% de Aquate Fish FT resultou em maior concentração de globulina no fígado dos animais, quando comparada aos animais que receberam a dieta controle.

O desafio com LPS, evidenciou uma tentativa do organismo em responder ao desafio, resultando em aumento na catalase e atividade da lisozima. Souza et al., 2020 e Ha et al., 2017 observaram respectivamente em surubins (*Pseudoplatystoma sp*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) maior concentração de lisozima após o desafio com LPS, demonstrando que assim como neste trabalho, os animais apresentaram capacidade de responder ao desafio a fim de defender o organismo contra o invasor. A utilização do Aquate Fish FT possibilitou um aumento de hematócrito e hemoglobina, demonstrando maior preparo imunológico nos animais suplementados.

Assim como os vertebrados superiores, os peixes possuem os dois sistemas de defesa antioxidante endógenos: enzimático e não enzimático O sistema enzimático é composto por constituintes primários, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase (GUERRIERO et al., 2002). Em peixes, estudos evidenciam a atividade da catalase em evitar o acúmulo de metahemeglobina e decomposição do peróxido de hidrogênio (AKNES; NJAA, 1981; VASYLKIV et al., 2011). Neste experimento, Aquate Fish FT apresentou diferenças significativas nos valores de catalase nos peixes avaliados e foi possível verificar a maior atividade quando se aumenta a inclusão do Aquate Fish FT na dieta.

O efeito antioxidante do zinco, componente estrutural e catalítico da SOD, pode ser atribuído à habilidade de manter esta enzima ativa. Neste estudo foi possível observar uma menor atividade hepática da CAT nos peixes que receberam a dieta controle quando comparada a dieta com 0,8% de Aquate Fish FT, sem alteração significativa entre os tratamentos para a atividade hepática da SOD. O sistema imunológico é limitado pelo estresse oxidativo, menores atividades enzimáticas no grupo controle de catalase indica que o sistema imunológico destes animais produziu menor quantidades de proteínas protetoras das células.

3.5 CONCLUSÃO

O uso de mananoligossacarídeos e de minerais orgânicos apresentou efeitos positivos sobre os parâmetros imunes, sendo observado maior atividade de lisozima e concentração de globulinas nos peixes que receberam a dieta com 1,2%. Após o desafio com LPS os animais apresentaram maior lisozima e menor hematócrito. Os resultados sugerem que o Aquate Fish FT melhorou a saúde dos peixes com maior preparo do sistema antioxidante contra estresse oxidativo.

3.6 REFERÊNCIAS

ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, p. 21-29, 2013.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKSNES, A.; NJAA, L. R. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. Comparative **Biochemistry Physiology**, v. 69 B, p. 893-896, 1981.

ANDREWS, S. R.; SAHU, N.P.; PAL, A. K.; MUKHERJEE, S. C.; KUMAR, S. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haematoimmunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 103-109, 2011.

ANDREWS, S. R.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; KUMAR, S. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein *hydrolysate* and *chlorella*. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 61-69, 2009.

APINES-AMAR, M. J. S., SATOH, S., CAIPANG, C. M. A., KIRON, V., WATANABE, T., AOKI, T. Amino acid-chelated: a better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture,** v. 240, p. 345-358, 2004.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; SAITA, M. V.; GIMBO, R.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus.* **Brazilian Journal of Biology,** v. 73, n. 2, p. 425-429, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASH, L. S.; MINGATTO, F. E.; URBINATI, E. C. The immune system is limited by oxidated stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pau *Piaractus mesopotamicus***. Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, p. 360-367, 2015

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.) Biochemical Toxicology, Oxford, IRL Press, p. 217-254, 1987.

CHOUDHURY D.; PAL A. K., SAHU N.P.; KUMAR S., DAS S. S.; MUKHERJEE S.C. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita L*.) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology,** v.19, p. 281-291, 2005.

CONGLETON, J.; WAGNER, E. Acute-phase hypoferremic response to lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry Physiology,** v. 98A, n. 2, p. 195-200, 1991.

CUNNINGHAM, M. D.; SEACHORD, C.; RATCLIFFE, K.; BAINBRIDGE, B.; ARUFFO, A.; DARVEAU, R. P. *Helicobacter pylori* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides are poorly transferred to recombinant soluble CD14. **Infect. Immunol.,** v. 64, p. 3601-3608, 1996.

DE ARAUJO, J. A.; DA SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; DE LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasileria** v.1, n.3, p. 67-77, 2007.

FLORES QUINTANA, C. Respostas locais e sistêmicas por endotoxinas em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) tratados com cromo. 67f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2002.

FURUYA, W. M. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias.** Toledo: GFM, p. 79-82, 2010.

GIMBO, R. Y. Suplementação dietética de selênio e vitamina E: variáveis fisiológicas e desempenho de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Mestre em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2011.

GLYNN A. A. The complement lysozyme sequence in immune bacteriolysis. **Immunology**; v.16: p.463–471, 1969.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GUERRIERO, G.; DI FINIZIO, A.; GARCIA, G. Stress induced changes of plasma antioxidants in aquatic sea bass. **Compendium of Biochemistry and Physiology**, part. A, v. 132, p. 205-211, 2002.

HA, N.; GONÇALVES, A. F. N.; SOUZA, L. C.; BILLER TAKAHASHI, J. S.; TAKAHASHI, L. S. Efecto de Actigen em las dietas de polos de engorde sobre el rendimento, inmunidad e integriad intestinal. **Aquaculture International**, n. 25, p.755-776, 2017.

HARDY, R. W. Nutritional deficiency in commercial aquaculture: likelihood, onset and identification. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D (eds). **Nutrition and Fish Health.** The Haworth Press Inc. Binghamton, New York, p.131-147, 2001.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, v. 317, n.1, p. 1-15, 2011.

JOLLÉ S, P.; JOLLÉ S, J. What's new in lysozyme research. **Molecular Cellular. Biochemistry**, v.63, p. 165–189, 1984.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolites from phagocytes. In GALLIN, J.L., SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic principles and clinical correlates**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins p. 721-768, 1999.

KLEIN, J. **Immunology.** Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. p. 311-334, 1990.

KYLE NEWMAN. Bio-Mos: **Opportunities for Improving Health and Production.** Venture Laboratories, Inc. 2001

KUBTIZA, F.; KUBTIZA, L. M. M. **Qualidade da água no cultuvo de peixes**, 1º Ed. Jundiaí –, SP; 2013.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; E FROYSADAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species**. Diseases of Aquatic Organisms,** v.6, p.1-5, 1989.

NEUMANN, N. F., STAFFORD, J. L., BARREDA, D., AINSWORTH, A. J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, n.8 - 9, p. 807-825, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washingtown: National Academic Press; p.164-184, 2011.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A., HIDALGO, M. C., MORALES, A. E., ARIZCUN, M., ABELLÁN, E., CARDENETE, G. Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex* fed on different dietary macronutrient levels. Comparative Biochemistry and Physiology *Part C:* **Toxicology & Pharmacology**, v. 150, p. 537-545, 2009.

RANZANI PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B. P.; TAVARES DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**, 1ª ed.; EDUEM 2014.

SAHOO, P. K.; KUMARI, J.; MISHRA, B. K. Non- specific immune responses in juveniles of Indian major caps. **Journal of Applied Ichthyology,** v.21, n. 2, p. 151-155, 2005.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. The effects of dietary immunomodulation upon *Edwarsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rahio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, v. 1, p. 1-16, 2002.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63–92, 1999.

SALEH, R.; BETANCOR, M. B.; ROO, J.; MONTERO, D.; ZAMORANO, M. J.; IZQUIERDO, M. Selenium levels in early weaning diets for gilthead seabream (*Paralichthys olivaceus)* larvae. **Aquaculture,** v. 426, p. 256-263, 2014.

SAURABH, S. P; SAHOO, K. Lysozyme: an important defence molecule of Fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 223-239, 2008.

SOUZA, L. C.; MOROMIZATO, B. S.; ALMEIDA, V. N. S.; MIASAKI, C. T.; TAKAHASHI, L. S.; BILLER, J. D. There is more than one way of feeding carnivorous fish: Surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *P corruscans*) are able to cope with carbohydrates rich diets, but there is a trade-off between growth and immunity, **Animal Feed Science and Technology.** v. 262, 2020.

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v. 58, p. 731-736, 1949.

TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - A training manual. The essential nutrients. Brasilia: **FAO**, p. 117, 1990.

TAKAHASHI, L. S.; BILLER-TAKAHASHI, J. D.; MANSANO, C. F. M.; URBINATI, E. C.; GIMBO, R. Y.; SAITA, M. V. Long-term organic selenium supplementation overcomes the trade-off between immune and antioxidant systems in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 60, p. 311-317, 2017.

VAL, A. L.; MENEZES, A. C. L.; FERREIRA, M. S.; SILVA, M. DE N. P. DA; ARAUJO, R. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação. In: Silva-Souza, A.T. (org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: Abrapoa, p. 211-228, 2006.

VASYLKIV, O. Y.; KUBRAK, O. I.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 1, p. 1-5, 2011.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

VIADANNA, P. H. O. Uso de imunoestimulante *Saccharomyces cereveriae* em peixes das espécies *Cyprinus carpio*. (Dissertação de Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

WENDEMEYER, G. **Physiology of fish in intensive culture system.** New York: Chapman e Hall, p. 300, 1996.

WON, K. M.; KIM, S. M.; PARK, S. I. The effects of b-1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology**, v. 17, p. 29-38, 2004.

ZHOU, Q. C.; BUENTELLO, J. A.; GATLIN III D.M. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, v. 309, p. 253-252, 2010.

3.7 ANEXO 01

1- Desempenho zootécnico – 60 dias

Os resultados observados no desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com as dietas contendo diferentes níveis de Aquate Fish FT estão apresentados nas Tabelas 1, não sendo observadas diferenças (p> 0,05) entre os tratamentos.

Tabela 2 - Médias de peso final (PF), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), consumo, conversão alimentar (CA), taxa e eficiência proteica (TEP) e índice hepatossomático (IHS) de tilápias do Nilo alimentadas com Aquate Fish FT por 60 dias.

Variáveis	**Aquate Fish FT**				Valor de P
	0%	0,40%	0,80%	1,20%	
PF (g)	237,2 ± 3,8	218,8 ± 3,0	242,9 ± 16,6	232,1 ± 14,4	0,1923
GP (g)	193,0 ± 3,6	157,1 ± 3,3	178,2 ± 17,9	170,2 ± 14,2	0,2529
TCE (%)	3,6 ± 0,0	3,2 ± 0,0	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,1	0,2972
Consumo (g/peixe)	278,1 ± 8,4	238,5 ± 14,4	255,7 ± 19	247,4 ± 20,6	0,3649
CA (g)	1,44 ± 0,04	1,51 ± 0,07	1,51 ± 0,07	1,45 ± 0,03	0,7384
TEP (%)	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1	0,9088
IHS (%)	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,7165

Os valores são médios ± EP (n = 4).