

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

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

Evandro Bilha Moro

Engenheiro de Pesca

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

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

Evandro Bilha Moro
Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2022

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

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

Orientadora: Fabiana Pilarski

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

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

CDU 639.3.09



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: EVANDRO BILHA MORO

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

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

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)

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

Dr. JOÃO FERNANDO ALBERS KOCH (Participação Virtual)

Pesquisa e Desenvolvimento / Biorigin, Lençóis Paulista-SP

Prof. Dr. FERNANDO YUGO YAMAMOTO (Participação Virtual)

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

Pesquisador Científico II GIOVANI SAMPAIO GONCALVES (Participação Virtual)

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

Pesquisador ALTEVIR SIGNOR (Participação Virtual)

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

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2022

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Uso de nucleotídeos (NT) na alimentação de tilápia	15
Tabela 2 - Composição química da ração	29
Tabela 3 – ANOVA One-Way para desempenho produtivo de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos.....	33
Tabela 4 – Parâmetros hematológicos de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementada com nucleotídeos e desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos da tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i>	35
Tabela 6 - Concentração de glicose e cortisol para tilápia-do-Nilo durante o período experimental e após o desafio bacteriano.	37
Tabela 7 - Atividade enzimática de tilápia-do-Nilo alimentada com dietas suplementadas com nucleotídeos e desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i>	38
Tabela 8 - Atividade respiratória dos leucócitos para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e após desafio bacteriano.	39
Tabela 9 - Atividade lisozima para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e após desafio bacteriano.	39
Tabela 10 - Análise de covariância PROC MIXED para os parâmetros de composição corporal disponíveis através do DXA para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i>	40
Tabela 11 – Ingredientes utilizados na composição da dieta experimental e composição química analisada.....	49
Tabela 12 – Desempenho produtivo de tilápia-do-Nilo alimentados por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo. Porcentagem do ganho em peso (GP), fator de condição (FF), ganho em peso diário em gramas (GPD), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência proteica (TEF).	57
Tabela 13 - Índice hepatossomático, gordura viscerossomático, rendimento de carcaça e filé de tilápia-do-Nilo alimentados por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo. ..	58
Tabela 14 – Parâmetros hematológicos de tilápia-do-Nilo após 90 dias de alimentação com dietas suplementadas com nucleotídeo.	60
Tabela 15 - Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo após 90 dias de alimentação com dietas suplementadas com nucleotídeo e inoculadas com cepa inativada de <i>Streptococcus agalactiae</i>	61
Tabela 16 – Atividade respiratória de leucócitos de tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiadas com cepa inativada de <i>Streptococcus agalactiae</i>	62
Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos da tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeos.....	65
Tabela 18 – Parâmetros bioquímicos da tilápia-do-Nilo após 90 dias de alimentação com dietas suplementadas com nucleotídeos e desafiadas contra <i>Streptococcus agalactiae</i> inativada.....	66

Tabela 19 – Atividade enzimática alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) de tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiadas com cepa inativada de <i>Streptococcus agalactiae</i>	67
Tabela 20 – Atividade da lisozima ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) de tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiadas com cepa inativada de <i>Streptococcus agalactiae</i>	68
Tabela 21 – Tempo expresso em minutos da atividade do sistema complemento de tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiadas com cepa inativada de <i>Streptococcus agalactiae</i>	69
Tabela 22 - Valores para o conteúdo mineral ósseo (CMO), densidade mineral óssea (DMO), massa gorda (MG), massa magra e conteúdo mineral ósseo (MM + CMO), massa total (MT) e lipídeos (LIP) de tilápia-do-Nilo após 90 dias de alimentação com diferentes níveis de inclusão de nucleotídeo.....	70
Tabela 23 - Composição corporal por avaliação bromatológica	71

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura da base nitrogenada dos nucleotídeos: pirimidina uracila, citosina e timina; purina: adenina, guanina, hipoxantina e xantina. Retirado de Carver & Walker (1995).....	12
Figura 2 - Origem biosintética dos átomos em bases purinas e pirimidinas. Retirado de Carver & Walker (1995).....	12
Figura 3 – Estruturas de adenina. Retirado de Carver & Walker (1995).....	13
Figura 4 - Imagem do peixe escaneado em DXA.....	42
Figura 5 – Porcentagem de sobrevivência (%) da tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de nucleotídeos e desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i> . C: tratamento controle desafiados com a bactéria viva; C-: peixes que foram inoculados com PBS; C+: peixes que não sofreram desafio bacteriano; N1: peixes alimentados com 37 mg kg ⁻¹ e desafiados com a bactéria viva; N2: peixes alimentados com 75 mg kg ⁻¹ e desafiados com a bactéria viva; N1: peixes alimentados com 150 mg kg ⁻¹ e desafiados com a bactéria viva.	43
Figura 6 – Índice hepatossomático (IHS) ($P = 0,02$) e Índice de gordura viscerossomática (IGVS) ($P = 0,02$) de tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeos.	58
Figura 7 – Atividade respiratória de leucócitos da tilápia-do-Nilo durante o período de alimentação e após o desafio bacteriano.....	63
Figura 8 - Atividade do sistema complemento (via alternativa).....	70
Figura 9 – Sobrevivência de tilápia-do-Nilo desafiada contra <i>Streptococcus agalactiae</i> via intraperitoneal. Tratamento controle 6,67%; suplementação de 250 mg kg ⁻¹ de nucleotídeo na forma extrusada 3,33%; suplementação de 500 mg kg ⁻¹ de nucleotídeo na forma extrusada 0,00%; suplementação de 1.000 mg kg ⁻¹ de nucleotídeo na forma extrusada 0,00%; suplementação de 250 mg kg ⁻¹ de nucleotídeo via <i>coating</i> 3,33%; suplementação de 500 mg kg ⁻¹ de nucleotídeo via <i>coating</i> 0,0%; suplementação de 1.000 mg kg ⁻¹ de nucleotídeo via <i>coating</i> 3,33%.	72

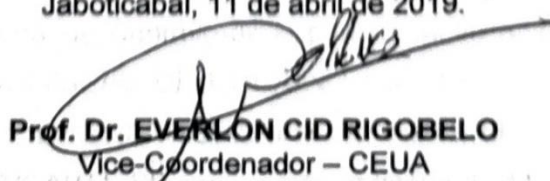
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 11 de abril de 2019.


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

Sumário

RESUMO.....	1
Revisão de literatura	3
Aquicultura: cenário atual.....	3
Tilapicultura.....	4
Principais desafios sanitários na tilapicultura	5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6
Sistema imune dos peixes	8
Sistema imune inato (inespecífico).....	9
Sistema imune adquirido (específico).....	10
Aditivos funcionais	10
Nucleotídeos	11
Incorporação de nucleotídeo na ração	19
Referências.....	20
 CARACATERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADA COM NUCLEOTÍDEOS E DESAFIADAS CONTRA <i>Streptococcus agalactiae</i> NÃO TIPÁVEL	26
Introdução	26
Materiais e métodos	27
Delineamento experimental	28
Dieta experimental	28
Amostragem para colheita de sangue	29
Análises hematológicas.....	30
Análises bioquímicas	30
Atividade enzimática (AST e ALT).....	30
Atividade respiratória leucócitos	31
Atividade da lisozima	31
Composição corporal	31
Desafio bacteriano	32
Desafio com a bactéria inativa.....	32
Análise estatística	33
Resultados.....	33

Desempenho produtivo	33
Hematologia.....	34
Análises bioquímicas	35
Atividade enzimática	37
Atividade respiratória de leucócitos	38
Lisozima.....	39
Composição corporal	40
Sobrevivência após o desafio com a bactéria viva	42
Conclusão.....	44
Referências.....	45

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA HEMATO-IMUNOLÓGICA INDUZIDA POR NUCLEOTÍDEO EM TILÁPIA-DO-NILO DESAFIADA COM *Streptococcus agalactiae*

Introdução	46
Materiais e métodos	47
Delineamento experimental	48
Dieta experimental	48
Desempenho produtivo	50
Amostragem para colheita de sangue	51
Análises hematológicas.....	51
Atividade respiratória leucócitos	52
Análises bioquímicas	52
Atividade enzimática (AST e ALT).....	52
Atividade lisozima	52
Atividade Complemento	53
Composição corporal	53
Desafio bacteriano com <i>Streptococcus agalactiae</i> não tipável vivo	54
Desafio com a bactéria inativa.....	55
Análise estatística	55
Resultados.....	55
Desempenho produtivo	55
Análises hematológicas.....	59
Atividade respiratória de leucócitos (Burst)	62
Análises bioquímicas	63

Atividade enzimática	64
Atividade lisozima	68
Atividade do complemento (via alternativa)	68
Composição corporal	70
Sobrevivência após desafio bacteriano com <i>Streptococcus agalactiae</i> vivo.....	72
Discussão	73
Conclusão.....	77
Referências.....	78

SOBREVIVÊNCIA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM DIETA SUPLEMENTADA COM NUCLEOTÍDEO E DESAFIADA COM *Streptococcus agalactiae* SOROTIPO NÃO TIPÁVEL.....82

Introdução	82
Materiais e métodos	83
Delineamento experimental	83
Dieta experimental.....	84
Desempenho produtivo	85
Desafio bacteriano	86
Análise estatística	86
Resultados e Discussão.....	86
Conclusão.....	91
Referências.....	92

Considerações finais	95
----------------------------	----

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

Revisão de literatura

Aquicultura: cenário atual

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

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

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

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

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

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

Tilapicultura

A tilapicultura, termo usado para a produção de tilápia, é uma importante atividade para suprir a demanda por proteína nos países em desenvolvimento, gerar empregos e renda (DELANNOY et al., 2021).

A tilápia é o nome comum para peixes da família Cichlidae, dos gêneros *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*, um peixe de importância comercial, popular, produzido em todo o mundo (WADE et al., 2002; WANG e Lu, 2016). Com distribuição em todos os continentes, a tilápia ocupa a quarta posição entre os peixes mais produzidos no mundo e o primeiro lugar entre os peixes de produção no Brasil, que teve crescimento de 12,5% em 2020, alcançando 486.155 toneladas no ano (FAO, 2020; PEIXEBR, 2021). Características como adaptação aos diferentes sistemas produtivos, rápido crescimento, alta taxa reprodutiva, baixa susceptibilidade as doenças, boa qualidade de carne e baixo nível trófico de alimentação tornam a tilápia um peixe de grande aceitabilidade à produção e ao consumo (WADE et al., 2002; NGUYEN et al., 2009).

A tilapicultura apresentou crescimento significativo na última década, e exerce um papel de destaque na aquicultura de água doce (MATLALA et al., 2013). A expansão na escala de produção e a industrialização geram fatores como alta densidade de estocagem, manejo inadequado, redução da qualidade de água, que representam um grande obstáculo à sua expansão (BARROS et al., 2014). Como consequências disso, condições estressantes aos animais têm causado surtos de doenças (IWAMA et al., 2011), fato que compromete a produção aquícola e gera graves perdas econômicas (BAYLISS et al., 2017; DING et al., 2021).

Com o uso da tecnologia e práticas de gestão eficientes é possível criar estratégias que possibilitem uma produtividade eficiente com menores danos ao meio ambiente (ESTAIANO DE REZENDE et al., 2021). Para isso, são necessárias pesquisas e o desenvolvimento de métodos pelos quais os peixes tenham um melhor desempenho produtivo, melhor utilização da ração e maior resistência imunológica (WADE et al., 2002).

Existem estratégias de suplementação alimentar desenvolvidas para diversas espécies de peixes,

no qual, o uso de imunomoduladores, tem sido aplicada à tilápia-do-Nilo, a fim de promover o desenvolvimento de dietas funcionais para essa espécie (BARROS et al., 2014). Assim, novos produtos para melhorar a resistência imunológica da tilápia são estratégias importantes para melhorar a sustentabilidade de sua produção (ESTAIANO DE REZENDE et al., 2021).

Principais desafios sanitários na tilapicultura

A intensificação da produção de tilápia aumentou não só a produtividade, mas também os desafios a serem superados. Os desafios incluem os estresses físico, químico e biológico, associados principalmente à alta densidade de estocagem. Considerada como um estressor, a alta densidade afeta negativamente a ingestão de alimentos e, conseqüentemente o crescimento, processos fisiológicos e sobrevivência dos peixes (ALIABAD et al., 2022). Nestas condições, os peixes se encontram imunossuprimidos, o que provoca inúmeros desafios sanitários associados às infecções ou doenças bacterianas, virais e parasitárias, além de problemas ambientais devido à deterioração da qualidade da água (HOSSAIN et al., 2020). Como conseqüências, têm sido constatadas perdas econômicas, as quais comprometem a produção em quantidade e qualidade, pois mesmo quando não há mortalidade, há o aparecimento de lesões no animal que inviabilizam sua comercialização, além de ser uma ameaça ao ambiente, por ser uma fonte de infecção (AMENYOGBE et al., 2020).

Embora existam inúmeras bactérias patogênicas que afetam a tilápia, as principais doenças bacterianas são causadas pelo grupo das *Aeromonas* móveis, *Edwardsella spp*, *Flavobacterium columnare*, *Francisella orientalis*, *Streptococcus (agalactiae, iniae e dysgalactiae)* (LEIRA et al., 2017).

A *S. agalactiae* é considerada o principal risco sanitário para a criação de tilápia no Brasil, devido às altas taxas de mortalidade que provoca. Essa bactéria é considerada um desafio à produção desde o início do século XXI (WADE et al., 2002; MIAN et al., 2009).

O produtor quando não realiza o diagnóstico correto dos patógenos responsáveis por surtos de morbidade e mortalidade em sua produção, comumente acaba utilizando antimicrobianos, muitas vezes de forma errônea e sem critérios na tentativa de controlar o surto e evitar grandes prejuízos econômicos (LEIRA et al., 2017; ESTAIANO DE REZENDE et al., 2021). Contudo, essa prática é motivo de discussões entre consumidores e cientistas, principalmente com relação

ao acúmulo de resíduos de antimicrobianos e outros produtos na carne do pescado, água e sedimento, e no desenvolvimento de cepas resistentes aos antimicrobianos. Fatores que acarretaram a proibição do uso de antimicrobianos de uso humano em dietas para animais na União Europeia em 2006 e nos Estados Unidos em 2013, e regulamentações mais rigorosas em outros países (AMENYOGBE et al., 2020; HOSSAIN et al., 2020).

Frente a este cenário, pesquisadores têm buscado maneiras de controlar surtos de doenças e a promoção da saúde dos animais aquáticos, pois os peixes podem ser portadores assintomáticos de agentes infecciosos e, quando alguma situação estressante acomete os animais, os patógenos se manifestam e podem facilmente ser transmitido para todo o plantel. Desta forma, manejos que reduzam o estresse podem ser um grande avanço na piscicultura (LEIRA et al., 2017). Como forma de prevenir surtos de doenças e reduzir, ou até mesmo evitar o uso de antimicrobianos, encontram-se as vacinas, a seleção de espécies que sejam resistentes a determinados patógenos e estratégias nutricionais que empreguem aditivos alimentares, os quais incrementam o sistema imunológicos dos animais (HOSSAIN et al., 2020).

Streptococcus agalactiae

A estreptococose é uma infecção bacteriana relatada em diversos países, que infecta aproximadamente 45 espécies de peixes de água doce, marinha e estuarina. Hoje, essa doença é a que mais impacta a produção de tilápia em sistema intensivo nas Américas e uma das principais ameaças ao desenvolvimento sustentável da aquicultura mundial (WADE et al., 2002; LEIRA et al., 2017; DELANNOY et al., 2021). Causada pela bactéria *Streptococcus agalactiae*, um cocos gram-positivo, anaeróbico facultativo, imóvel, não esporulada, catalase e oxidase negativa, é considerada de alta virulência, principalmente para tilápias (JARVA et al. 2003; ASENCIOS et al., 2016).

A *S. agalactiae* é capaz de lesar o sistema nervoso central, causa surtos de septicemia e meningoencefalite nos peixes. Os principais sinais clínicos diagnosticados nos peixes infectados são perda do apetite, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade ou hemorragia ocular, abdômen distendido, curvatura da medula espinhal, natação errática, letargia, rigidez e hemorragia na base das nadadeiras (ASENCIOS et al., 2016). CAO et al., (2022) comprovaram através da qPCR que órgãos altamente irrigados, como o rim, baço e fígado, apresentam alta carga bacteriana.

A sotoripagem é utilizada para avaliar a estrutura populacional de uma cepa bacteriana (TAVARES et al., 2019). Os principais sorotipos de *S. agalactiae* associados às infecções em peixes no mundo são Ia, Ib e III, com apenas os sorotipos Ia e III comumente hemolíticos, os quais acometem tilápias (TAVARES et al., 2018). O sorotipo III tem potencial zoonótico e a possibilidade de ser transmitido entre peixes e humanos pela ingestão de peixe cru (TAN et al., 2016). No Brasil, o sorotipo predominante é o Ib (ST260, ST927 e não tipável) (LEAL et al., 2019). Diferenças genômicas entre as cepas podem estar associadas a polimorfismos nas sequências gênicas. As cepas não tipáveis possuem conteúdo genético não compartilhado pelas cepas depositadas em bancos genéticos, isso pode estar associado à adaptação do hospedeiro às condições do Brasil (BARONY et al., 2017).

Surtos provocados pela *S. agalactiae*, pelos sorotipos sequenciados em pisciculturas no Brasil, ocorrem geralmente no verão, quando a temperatura da água se encontra acima de 30° C, e são responsáveis pelos maiores prejuízos econômicos na produção comercial de peixes, podendo causar mortalidade de até 90% durante o ciclo de produção (MIAN et al., 2009; MARCUSSO et al. 2017).

A *S. agalactiae* pode afetar peixes de todos os tamanhos, desde as fases iniciais até adultos próximos a terminação (DELANNOY et al., 2021). Uma das dificuldades encontradas para o controle da bactéria é que ela é oportunista, isto é, faz parte da microbiota normal da água e do peixe. Agentes estressores, como condições inadequadas da água, elevada densidade de estocagem e manejo inadequado, suprimem o sistema imune dos peixes, o que desencadeia uma ação pela bactéria (SAKO, 1993). Medidas como manejo adequado, alimentação, utilização de antimicrobianos e produtos químicos são tomadas como os principais meios de controle da estreptococose (LONGHI et al., 2012; CAO et al., 2022). Contudo, ainda se faz necessário estratégias de inovações, métodos aprimorados na gestão da saúde dos peixes, como imunonutrição (aditivos alimentares), controle do ambiente, qualidade de água e redução do estresse de maneira segura e eficaz, a fim de evitar surtos de doenças, e para que os animais mantenham o bem-estar e a saúde, além de não provocar o acúmulo de resíduos no ambiente e no pescado, tornando a produção mais sustentável (WADE et al., 2002; DING et al., 2021).

Sistema imune dos peixes

O sistema imunológico é um mecanismo de defesa complexo, que utiliza diversos sistemas individuais para proteger os peixes de uma ampla variedade de microrganismos (URIBE et al., 2011). Devido à complexidade desse sistema, a resposta imunológica pode ser classificada em dois tipos: inata (inespecífica) e adquirida (específica) (BOWDEN, 2008; SITJÀ-BOBADILLA, 2008).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa dos peixes, mediada por barreiras físicas, químicas e células dispersas no organismo, também responsáveis pela estimulação da resposta imune adquirida. A resposta imune adquirida só irá se desenvolver após o contato com algum antígeno, por consequência, ela ocorre mais tardiamente. A associação das respostas imunológicas que compõe o sistema imune é o que assegura a sobrevivência do animal no ambiente, no qual está em contato direto com microrganismos patogênicos (KREUTZ et al., 2017).

Os microrganismos possuem moléculas específicas que os diferenciam de outras células, as quais são conhecidas como PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) (WILKINS & GALE, 2010). As células imunológicas possuem receptores de reconhecimento padrão (PRR - *Pattern Recognition Receptors*), que reconhecem os microrganismos através da interação com o PAMPs (PALTI, 2011). Essa interação irá desencadear estímulos nas células imunológicas, sendo o primeiro e mais importante aspecto imune (KREUTZ et al., 2017).

Com relação aos órgãos que desempenham papéis fundamentais na resposta imune, o timo, o rim e o baço são os principais órgãos linfoides em teleósteos (ZAPATA et al., 2006; URIBE et al., 2011). O timo é o primeiro órgão a se tornar linfóide, ele é considerado uma agregação de macrófagos, responsável pela produção de células T. O rim é o maior local de hematopoiese até a idade adulta. Nele são encontrados macrófagos, que se agregam formando melanomacrófagos, e células linfoides, encontradas em todos os estágios de desenvolvimento. O baço é composto por melanomacrófagos, tecido linfóide e elipsoides esplênicos (capilares de paredes espessas). As células que o compõe participam ativamente da fagocitose de antígenos por macrófagos, possuindo um papel importante na memória imunológica (URIBE et al., 2011).

A resposta humoral dos peixes pode ser influenciada por diversos fatores externos como a temperatura, iluminação, qualidade da água, salinidade entre outros que afetem suas funções fisiológicas e que possam causar estresse ao animal (MAGNADOTTIR, 2010). Apenas o controle desses fatores pode não ser suficiente para a saúde animal, uma vez que a imunidade inata do

indivíduo é transmitida passivamente na maternidade. Um estímulo ao sistema imune pode ser feito através da vacinação, normalmente através de injeção intraperitoneal em peixes. Contudo, existem complicações para utilização deste método nas fases larvais, que é uma das fases mais críticas (KREUTZ et al., 2017). Uma alternativa a vacinação, é o estímulo do sistema imunológico via alimentação suplementada com moléculas imunomoduladoras (BARROS et al., 2015).

Sistema imune inato (inespecífico)

A resposta imune inata é um componente essencial ao combate de patógenos. Comumente é dividida em três compartimentos: barreira epitelial, composta pela mucosa da pele, brânquias e intestino, está em contato direto com agentes potencialmente nocivos; parâmetros humorais, que podem ser receptores celulares ou moléculas que são solúveis no plasma e outros fluidos corporais; e componentes celulares (URIBE et al., 2011).

A fagocitose é um dos processos de defesa mais importantes em animais ectotérmicos, pois não é influenciada pela temperatura (MAGNADOTTIR et al., 2005). As principais células fagocíticas são os neutrófilos e macrófagos, capazes de combater bactérias pela produção de espécies reativas de oxigênio durante uma explosão respiratória. Os neutrófilos também possuem mieloperoxidase em seus grânulos citoplasmáticos, capazes de matar bactérias por halogenação da parede celular (FISCHER et al., 2006; URIBE et al., 2011).

A lisozima é uma enzima bacteriolítica amplamente distribuída por todo o corpo (URIBE et al., 2011). Sua ação envolve a hidrólise do peptidoglicano da parede celular bacteriana, resultando em lise celular. Essa enzima é conhecida por desencadear uma opsonina do sistema complemento e das células fagocíticas (MAGNADOTTIR, 2006).

O sistema complemento pode ser ativado de três maneiras: a via clássica, que é desencadeada pela ligação de anticorpos a superfície celular (HOLLAND & LAMBRIS, 2002); a via alternativa, independente de anticorpos, é ativada diretamente por microrganismos; e a via da lectina que é ativada pela ligação de um complexo de proteínas que consiste em manose / lectina ligadora de manose nas células bacterianas (SAKAI, 1992). Quando ocorrem infecções bacterianas, o complemento é ativado por lipopolissacarídeos presentes na parede celular de bactérias patogênicas gram-negativas, estimula a produção da quimiocina C5a para macrófagos e neutrófilos que possuem receptores C3, uma molécula central do complemento presente nas três vias, e permanece aderido à bactéria favorecendo a fagocitose (JENKINS & OURTH, 1993).

Sistema imune adquirido (específico)

A resposta imune específica ocorre por mecanismos que envolvem uma rede de células especializadas, proteínas, genes e mensagens bioquímicas, as quais fornecem os meios necessários para que o indivíduo responda aos antígenos, anticorpos e células efetoras com alta especificidade e afinidade (URIBE et al., 2011).

Os anticorpos em teleósteos podem ser encontrados na pele, intestino, muco das brânquias, bile e sistematicamente no plasma. Particularmente, alguns anticorpos específicos podem ser encontrados na pele, intestino e brânquia sem a necessidade de gerar uma resposta sistêmica (CAIN et al., 2000). As citocinas envolvidas na imunidade adaptativa conduzem a ativação e diferenciação de subconjuntos de células T auxiliares para liberar diferentes repertórios de citocinas (SECOMBES, 2008).

Os peixes podem desenvolver uma memória imunológica desde a primeira exposição a um antígeno (WHITTINGTON et al., 1994). Estudos da comunicação entre os sistemas inato e adquirido, em espécies de mamíferos, são de particular interesse em peixes, levando em consideração a avaliação do período frequentemente longo desde a infecção até que uma resposta específica seja detectada (MAGNADÓTTIR, 2006).

Aditivos funcionais

A ingestão de alimentos desempenha um papel importante na história de vida dos organismos e está intimamente ligada aos processos metabólicos e de crescimento (NÄSLUND e HELLSTRÖM, 2007). A alimentação é o maior custo na produção intensiva de peixes, portanto deve-se buscar além de satisfazer as necessidades nutricionais básicas, uma dieta que promova um bom desempenho produtivo e mantenha a saúde, além de ser economicamente viável (LI & GATLIN, 2005; HASSAAN et al., 2019).

Aditivos funcionais, embora sejam definidos como não nutritivos, são incorporados nas dietas com intuito de influenciar as propriedades físicas ou químicas e conferir um bom desempenho produtivo do animal (COUTTEAU, 2006). A busca por alimentos funcionais que beneficiem os organismos aquáticos tais como prebióticos, probióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, passaram a ser utilizados na piscicultura para obter um bom desempenho produtivo e prevenir surtos de infecções (IRIANTO & AUSTIN 2002). Diversos estudos têm apresentado esses aditivos como promotores de crescimento e redução da incidência de doenças, sem qualquer

impacto negativo nas espécies e no ambiente, além de efetivamente reduzirem os custos de produção (NICOLAS et al., 2007; WANG et al., 2008).

Incluídos como suplementos dietéticos, os aditivos funcionais têm se tornado uma importante alternativa para lidar com os desafios da produção aquícola intensiva (HOSEINIFAR et al., 2020). Como aditivos, os imunomoduladores visam melhorar as respostas de defesa contra patógenos aos quais os peixes estão expostos e conseqüentemente, minimizam a utilização de antimicrobianos (OLIVA-TELES, 2012). Desta forma, a adição de imunomoduladores nas dietas para organismos aquáticos deve aumentar substancialmente nos próximos anos, devido à mudança dos controles regulatórios globais que tentam tornar a aquicultura mais sustentável (AMENYOGBE et al., 2020). Além disso, esses autores afirmam que a expansão da aquicultura será impossível ou mal sucedida sem a administração de aditivos dietéticos eficientes. Portanto, a alimentação aquática funcional deve ser economicamente atrativa e ecologicamente sustentável (HOSSAIN et al., 2020).

Nucleotídeos

Os nucleotídeos são compostos de grande importância para a função celular e para o metabolismo animal. São os blocos de construção dos ácidos nucléicos, DNA e RNA, consistem em uma base nitrogenada, um açúcar pentose e um ou mais grupo fosfato, e fornecem energia metabólica (LIN et al., 2009; CHENG et al., 2011). A base nitrogenada é uma pirimidina (Uracila (U), citosina (C) e timina (T)) ou uma base purina (adenina (A), guanina (G), hipoxantina e xantina) (Figura 1), cujos átomos são derivados principalmente de aminoácidos (Figura 2). A pentose é ribose ou desoxirribose e servem como unidades monoméricas de RNA e DNA, respectivamente (Figura 3) (CARVER & WALKER, 1995).

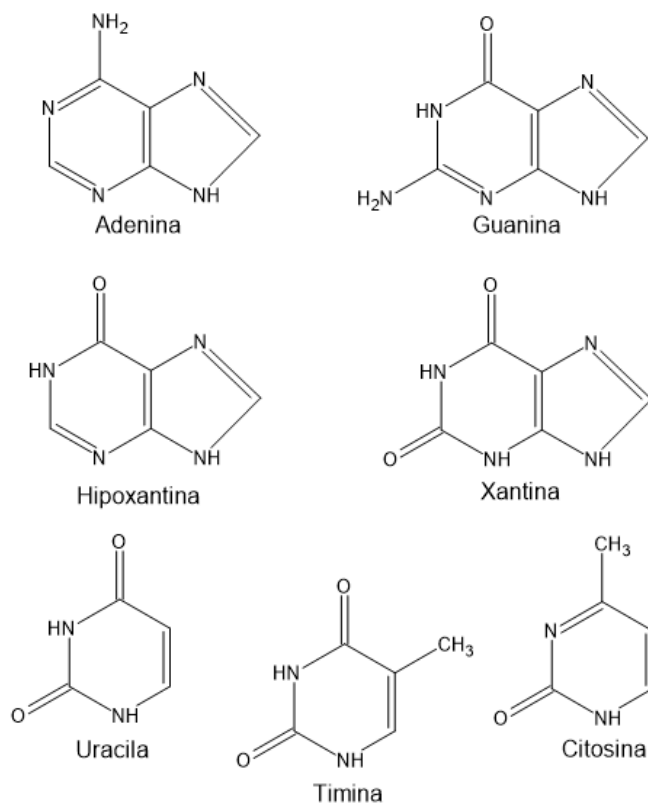


Figura 1 – Estrutura da base nitrogenada dos nucleotídeos: pirimidina uracila, citosina e timina; purina: adenina, guanina, hipoxantina e xantina. Retirado de Carver & Walker (1995).

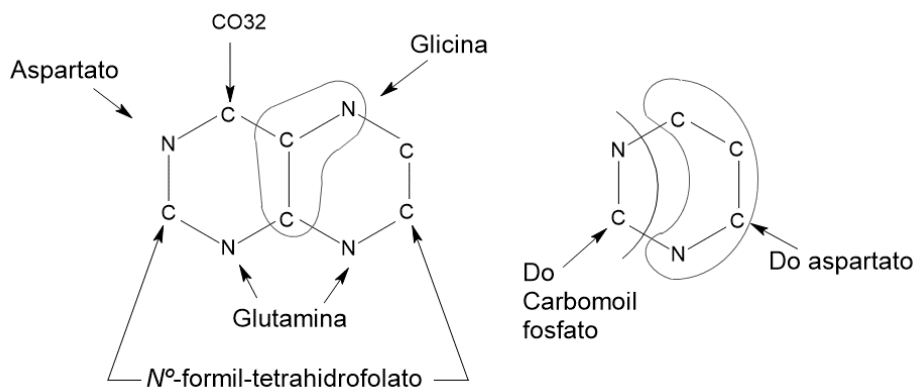


Figura 2 - Origem biosintética dos átomos em bases purinas e pirimidinas. Retirado de Carver & Walker (1995).

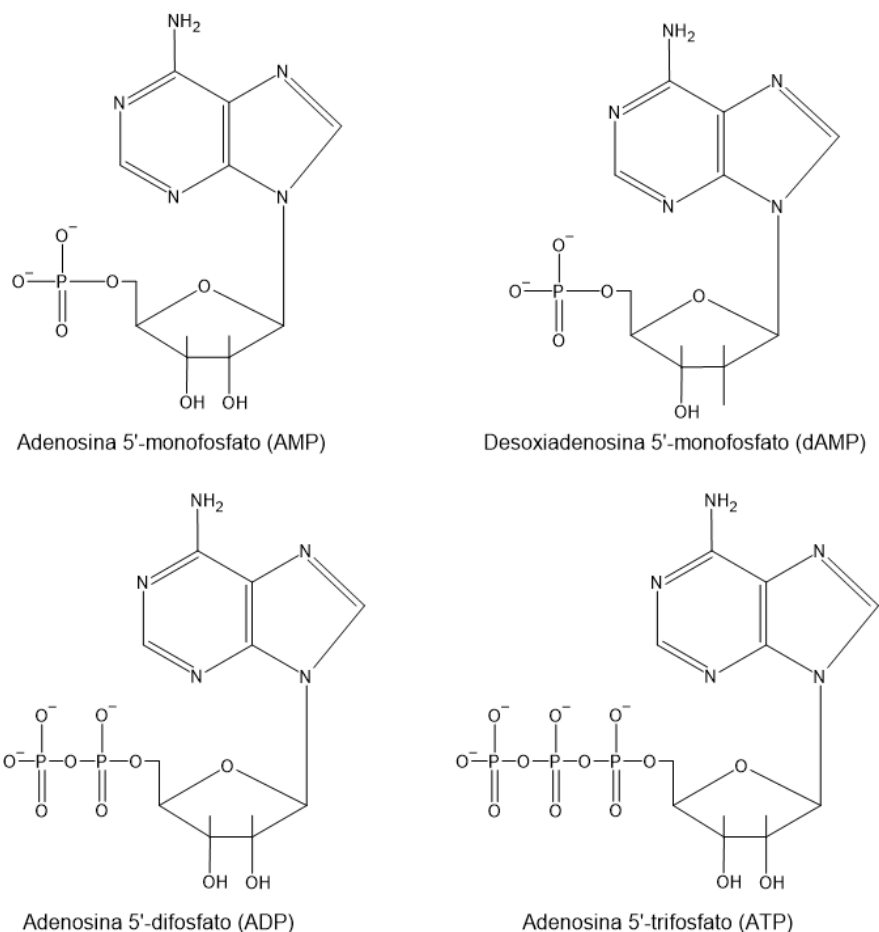


Figura 3 – Estruturas de adenina. Retirado de Carver & Walker (1995).

Os nucleotídeos podem servir como componentes da coenzima, moléculas reguladoras e participar da síntese de proteínas e imunocompetência (ANGUIANO 2011). São considerados nutrientes não essenciais e normalmente não essenciais, pois a síntese de purinas e pirimidinas por meio da *via de novo* ou pela *via de salvamento* é comumente suficiente em indivíduos saudáveis (CARVER, 1999; LI & GATLIN, 2006; Bowyer et al., 2019). No entanto, em condições adversas como estresse e/ou infecção, em que os animais estejam imunocomprometidos ou em rápido crescimento, a oferta endógena de nucleotídeos pode não ser suficiente e, sob tais circunstâncias, a suplementação dietética pode ser denominada como nutriente condicionalmente essencial (MATEO, 2005; HOSSAIN et al., 2020). Sob essas condições, a ingestão dietética dos nucleotídeos poupa o organismo do custo da *via de novo* ou da *via de salvamento* e pode otimizar a função do tecido (CARVER & WALKER, 1995).

Os nucleotídeos estão presentes em ingredientes de origem vegetal ou animal (FEGAN, 2006). De origem animal, alimentos como órgãos internos de animais (fígado, rim, coração) e pequenos peixes e mariscos são fortemente ricos em nucleotídeos dietéticos, já algumas leguminosas como o feijão, possuem quantidades relativamente altas de nucleotídeos em suas sementes (DOMÍNGUEZ-ÁLVARES et al., 2017). Além desses, proteínas unicelulares, tais como levedura de panificação e cerveja, são ingredientes que contém uma alta concentração de nucleotídeos (TIBBETS, 2002).

Os ingredientes frequentemente utilizados nas formulações de rações possuem baixa concentração de nucleotídeos. Portanto, a adição de nucleotídeos como suplementos dietéticos para peixes tem mostrados efeitos positivos no crescimento, melhora na qualidade das larvas, resistência ao estresse e modulação das respostas imune inata e adaptativa, conferindo maior resistência às infecções, se mostrando promissor na aquicultura (Tabela 1). No entanto, existe um consentimento entre pesquisadores de que os benefícios promovidos pela administração de nucleotídeos no desempenho e na resposta imune está relacionada a fonte da qual é extraído, o período de administração e a idade dos peixes (HOSSAIN et al., 2020). Portanto, é necessário estimar com precisão o nível de inclusão na dieta, pois quando mal administra, seja por tempo de administração ou dose em excesso, pode comprometer o desempenho do animal (OLIVA-TELES et al., 2003).

Tabela 1 – Uso de nucleotídeos (NT) na alimentação de peixes.

Espécie	Peso	Arraçoa- mento	Doses	Composição do produto	Principais resultados	Autor
<i>Oreochromis niloticus</i>	3,4 g	56 dias 2 x a 6% P:V:	500, 1.000 e 2.000 mg kg ⁻¹ de mistura de nucleotídeos dietéticos purificados.	A mistura de nucleotídeos dietéticos foi feita usando cinco sais de nucleotídeo 5'-monofosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de citidina, uridina, adenosina, inosina, guanosina e uma nucleo-base, timina	Não observou efeito significativo nos parâmetros de crescimento e composição corporal. Os peixes alimentados com as dietas contendo 0.5 e 1% de NT apresentaram valores de proliferação de linfócitos maior que os peixes que receberam a dieta basal. E peixes alimentados com as dietas contendo 0.5% de NT apresentaram maior produção de O ₂ ⁻ intracelular. Sugere que há efeitos relacionados às respostas imunes inata e adaptativa.	Anguiano (2011)
<i>Oreochromis niloticus</i>	64,5 g	28 dias 2 x ao dia	500, 1.000 e 2.000 mg kg ⁻¹ de mistura de nucleotídeos dietéticos em dieta purificada.	A mistura de nucleotídeos dietéticos foi feita usando cinco sais de nucleotídeo 5'-monofosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de citidina, uridina, adenosina, inosina, guanosina e uma nucleo-base, timina	No desafio bacteriano com <i>S. iniae</i> , os peixes alimentados com a dieta basal e dieta contendo 2.000 mg kg ⁻¹ de NT tiveram menor mortalidade média cumulativa, contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos.	Anguiano (2011)
<i>Labeo rohita</i>	2,7 – 3,1 g	60 dias 2 x ao dia 5% P.V. inicialmente	4.000 mg de RNA revestido em diferentes concentrações de quitosana (0, 4.000, 8.000 e 12.000 mg)	Nanopartículas de quitosana carregadas de RNA RNA (fonte: levedura) obtido de Sisco Research Laboratories, Mumbai, Índia (teor total de nitrogênio 5%; teor de fósforo 8%; água 10%).	O RNA dietético, não afetou a composição corporal, aumentou significativamente o crescimento, o desempenho, a imunidade e a sobrevivência após um desafio bacteriano contra <i>A. hydrophila</i> . O uso de quitosana para revestir as nanopartículas potencializou melhores resultados para o uso do RNA.	Ferosekhan et al., (2014)
<i>Oreochromis niloticus</i>	4.74 ± 0.03 g	4x ao dia ad libitum por 60 dias	0, 500, 1.000, 2.000 e 4.000 mg kg ⁻¹	Mistura comercial de nucleotídeos (AccelerAid – contendo 22,5% do total de nucleotídeos)	A mistura de NT aumentou o consumo de ração, principalmente com 1.000 mg kg ⁻¹ na dieta, contudo o crescimento e eficiência alimentar não diferiu da dieta controle. A contagem total de leucócitos, assim como a de linfócitos, foi maior para a dieta de 1.000 mg kg ⁻¹ , contudo não diferiu do controle.	Barros et al. (2015)

					A inclusão do NT tendeu a melhor sobrevivência quando desafiados contra <i>Aeromonas hydrophila</i> .	
<i>Oreochromis niloticus</i> × <i>Oreochromis aureus</i>	0,15 ± 0,005 g	70 dias 2x ao dia e 5% do P.V. por dia	0, 120, 240, 360, 480 e 600 mg NT kg ⁻¹ na dieta	Nucleotídeo (Rovimax NX, 80% nucleotídeos, DSM Nutrition Products, Basel, Suíça)	A suplementação com 120 a 240 mg NT kg ⁻¹ na dieta aumentou as respostas imunes e a sobrevivência contra <i>S. iniae</i>	Shiau et al. (2015)
<i>Oreochromis niloticus</i> × <i>Oreochromis aureus</i>	8,02 g	56 dias 2 x ao dia <i>ad libitum</i>	0, 150, 300, 600 e 1.200 mg kg ⁻¹ de dieta	Mix de NT: 49% de nucleotídeos (12 ± 1% de 5'-AMP, 10 ± 1% de 5'-CMP, 16 ± 1% de 5'-GMP · Na ₂ e 11 ± 1% de 5'-UMP · Na ₂), 35% de oligonucleotídeos e 10% de água, sendo os principais compostos por proteínas e polissacarídeos	Foi determinado a dose ótima de crescimento e eficiência alimentar em 630 e 810 mg kg ⁻¹ respectivamente. Os peixes alimentados com 600 e 1.200 mg kg ⁻¹ apresentaram maior atividade da SOD e menor nível de MDA. Lisozima sérica foi aumentada em 150 e 300 mg kg ⁻¹	Xu et al. (2015)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0,59 ± 0,1 g	60 dias Inicial de 10% P.V. finalizando a 5% P.V.	0, 100, 200, 400, 800 mg kg ⁻¹ de monofosfato de inosina (IMP) na dieta	IMP de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)	A suplementação de 200 a 800 mg kg ⁻¹ de IMP aumentou o crescimento muscular, promovendo hiperplasia e hipertrofia, e regulou positivamente a expressão do principal gene relacionado ao crescimento (GH, GHR-1, IGFs, MRFs, Pax7 e miostatina)	Asaduzzaman et al. (2017)
<i>Oreochromis niloticus</i>	5,91 ± 0,04 g	84 dias 2x ao dia <i>ad libitum</i>	0, 500, 1.000 e 1.500 mg kg ⁻¹ de extrato de levedura (CW-I).	Extrato de levedura (Mark Co., Ltd., Tóquio, Japão [CW-I]), contendo 104,4 g kg ⁻¹ nucleotídeos e 70,3 g kg ⁻¹ β-glucano.	O ganho em peso aumentou linearmente enquanto a CAA reduziu linearmente com o aumento dos níveis. 1.500 mg kg ⁻¹ promoveu aumento dos leucócitos e reduziu os níveis de colesterol, triglicerídeos, AST e ALT. A histologia do fígado e intestino mostrou alterações ligeiramente anormal nestes órgãos com a dieta controle e, com 1.500 mg kg ⁻¹ essas estruturas ficou quase inalterada.	Hassaan et al. (2018)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0,59 ± 0,1 g	60 dias 2 x ao dia com 5 – 10% do P.V.	0, 100, 200, 400 e 800 mg de monofosfato de inosina dietético (IMP) kg ⁻¹ de dieta	IMP de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)	A suplementação com IMP melhorou o desempenho dos peixes, aumentou os parâmetros hematológicos de hematócrito e hemácias. A proteína sérica total, atividade de lisozima, atividade de superóxido dismutase e atividade bacteriana tendem a aumentar com a suplementação de IMP.	Kader et al. (2018)

					Os peixes alimentados com IMP tiveram maior sobrevivência cumulativa quando desafiados contra <i>S. agalactiae</i> , contudo não diferiu estatisticamente. A atividade bactericida pós desafio foi significativamente menor no tratamento controle.	
<i>Danio rerio</i>	Larvas recém eclodidas	21 dias	Alimentação com náuplios e metanáuplios de <i>A. salina</i> enriquecidos com 0, 60, 180 e 300 mg de extrato de levedura de RNA.	RNA extraído de <i>Kluyveromyces fragilis</i> (contém 14% de matéria seca e 54% de proteínas brutas e 32% de RNA referente à quantidade de matéria seca). Processo patenteado ABAC R&D WIPO/PCT 2013/158587 A1 “Biomass hetero-colloidal systems production and uses of thereof.”	Os dados de expressão gênica mostraram a capacidade do extrato de levedura de RNA de regular os genes envolvidos no crescimento e restaurar a condição relacionada ao estresse devido ao desenvolvimento larval inicial acoplado à administração do extrato de levedura de RNA. O extrato de levedura de RNA atuou como redutor inflamatório, mas não potencializou a resposta imune. A análise histológica mostrou que todos os três grupos tratados apresentaram um epitélio intestinal mais espesso, criptas intestinais mais altas juntamente com comprimentos de enterócitos mais altos em comparação com o grupo controle.	Falcinelli et al., (2018)
<i>Oreochromis niloticus</i>	42,90 ± 0,14 g	30 dias 2x ao dia a 3% do P.V.	0, 50, 150 e 250 mg kg ⁻¹ de NT na dieta	Nucleoforce Fish™ (Bioiberica, Espanha) que inclui 34% de nucleotídeos livres de extrato de levedura inativada (80% de pirimidina e 20% de purina).	Proteína sérica total, albumina, globulina, contagem total de leucócitos, conteúdo de linfócitos e granulócitos foram maiores para os grupos alimentados com 250 mg kg ⁻¹ de NT. Atividade de lisozima sérica, ensaio de óxido nítrico, níveis de IgM e atividade anti-protease apresentou melhores resultados em 15 dias em comparação a 30 dias de alimentação. Ao desafiar contra <i>A. hydrophila</i> os grupos alimentados com NT apresentaram maior sobrevivência relativa.	Reda et al. (2018)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	62,19 ± 0,42 g	42 dias 2 x ao dia com 2% P.V. por 12 dias e posterior a 2,6% P.V.	0, 150 e 300 mg kg ⁻¹ de NT na dieta.	NT (Laltide®) - Lallemand Animal Nutrition UK; Spring Lane North. Malvern Link. Worcestershire. WR14 1B. - Derivada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Não houve diferença significativa para os parâmetros de desempenho e composição corporal. A morfologia intestinal melhorou com a suplementação de nucleotídeos, aumentando a área de superfície de absorção para digestão e assimilação de nutrientes.	Bowyer et al., 2019

<i>Oreochromis niloticus</i>	Fêmeas: 286 ± 7,15 g Machos: 536 ± 13,4 g	150 dias 2x ao dia a 1% P.V.	0, 2.500, 5.000, 7.500 e 10.000 mg NT kg ⁻¹ na dieta	Nucleotídeos purificados ASCOGEN®	Dietas contendo de 5.000 a 10.000 mg NT kg ⁻¹ aumentaram os níveis de hemoglobina. ALT foi menor nos grupos 2.500 e 7.500 mg NT kg ⁻¹ . ALP e triglicerídeos plasmáticos diminuíram com 7.500 mg NT kg ⁻¹ . Níveis superiores a 5.000 mg NT kg ⁻¹ aumentou a albumina e reduziu os níveis de cálcio plasmático. O glicogênio hepático foi maior com 5.000 mg NT kg ⁻¹ . SOD e GST foram maiores nos grupos 5.000 e 7.500 mg NT kg ⁻¹ .	De Lima et al. (2020)
<i>Oreochromis niloticus</i>	42,9 ± 0,14 g	60 dias a 3% P.V. 2x ao dia	0, 500, 1.500 e 2.500 mg NT kg ⁻¹ de dieta	Nucleoforce Fish™ (Bioiberica, Espanha) que inclui 34% de nucleotídeos livres de extrato de levedura inativada (80% de pirimidina e 20% de purina).	Maior desempenho de crescimento, conversão alimentar, eficiência proteica, AST, ALP, ureia, creatina com a dieta contendo 2.500 mg NT kg ⁻¹ . Maior teor de proteína e gordura corporal com as dietas contendo 500 e 2.500 mg NT Kg ⁻¹ . Os parâmetros hemato-bioquímicos apresentaram maiores valores para os peixes alimentados com NT. Efeitos estimulantes sobre a lipase, amilase e hormônio do crescimento foram observados para os peixes alimentados com NT. Expressão gênica de grelina e fator de crescimento semelhante a insulina apresentaram aumento significativo com 1.500 e 2.500 mg NT kg ⁻¹ .	Selim et al. (2020)

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; ALP: fosfatase alcalina; CAA: conversão alimentar aparente; GST: glutathione S-transferase; MDA: malondialdeído; NT: nucleotídeos; SOD: superóxido dismutase.

Incorporação de nucleotídeo na ração

Como a alimentação representa o custo mais elevado em uma produção de peixes, são necessárias estratégias alimentares a fim de otimizar o aproveitamento da inclusão dietética de aditivos funcionais (BARROS et al., 2014; ALIABAD et al., 2022). A principal forma de fornecimento da ração é extrusada, a qual passa por um processo de umidificação, de aquecimento entre 90 a 120°C e pressão para que ocorra a expansão do pellet. Dessa maneira, é necessário que o nucleotídeo passe por esse processo sem a perda de suas características. Uma vez demonstrado a segurança da inclusão de aditivos anterior ao processo de extrusão, torna possível o processamento em grande escala através das fábricas de rações.

Uma segunda opção é a incorporação do nucleotídeo após a extrusão, processo conhecido como *coating*. Neste caso, o procedimento pode ser realizado na indústria, logo após a extrusão ou, na propriedade rural em menor quantidade. No *coating*, utiliza-se um veículo para agregar o produto a dieta, tais como óleos, álcool, carboximetilcelulose (CMC), entre outros aglutinantes. No entanto, é importante evitar a perda das propriedades do aditivo por lixiviação na água e durante o trânsito gastrointestinal. Apesar de não haver relatos sobre a perda por lixiviação, estudos são necessários para uma melhor compreensão da nutrição de nucleotídeos em peixes (HOSSAIN et al., 2020).

Referências

- ALY, S. M.; ABD-EL-RAHMAN, A. M.; JOHN, G.; MOHAMED, F. M. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, v.277, p.1–6. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.021>.
- ALIABAD, H. S.; NAJI, A.; MORTEZAEI, S. R. S.; SOURINEJAD, I.; AKBARZADEH, A. Effects of restricted feeding levels and stocking densities on water quality, growth performance, body composition and mucosal innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry in a biofloc system. *Aquaculture*, v.546, p.737320. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737320>.
- AMENYOGBE, E., CHEN, G., WANG, Z., HUANG, J., HUANG, B., AND LI, H. The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions.: a review. *Aquaculture*, v.28, p.1017–1041. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00509-0>.
- ANGUIANO, M. Effects of dietary nucleotides on growth, immunology, and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thesis of master, Texas A&M University. 2011.
- ASADUZZAMAN M, IKEDA D, ABOL-MUNAFI AB, BULBUL M, ALI ME, KINOSHITA S et al. Dietary supplementation of inosine monophosphate promotes cellular growth of muscle and upregulates growth-related gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.468, p.297–306. 2017.
- ASENCIOS, Y. O.; SÁNCHEZ, F. B.; MENDIZÁBAL, H. B.; PUSARI, K. H.; ALFONSO, H. O.; SAYÁN, A. M.; FIGUEIREDO, M. A. P.; MANRIQUE, W. G.; BELO, M. A. A.; CHAUPE, N. S. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular indentification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports*, v.4 p. 74-79. 2016.
- BARROS, M. M.; GUIMARÃES, I. G.; PEZZATO, L. E.; ORSI, R. O.; JUNIOR, A. C. F.; TEIXEIRA, C. P.; FLEURI, L. F.; PADOVANI, C. R. The effects of dietary nucleotide mixture on growth performance, haematological and immunological parameters of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, v.46, p.987-993. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12229>.
- BAYLISS, S. C.; VERNER-JEFFREYS, D. W.; BARTIE, K. L.; AANENSEN, D. M.; SHEPPARD, S. K.; ADAMS, A.; FEIL, E. J. The promise of whole genome pathogen sequencing for the molecular epidemiology of emerging aquaculture pathogens. *Frontiers in Microbiology*, v.8, p. 1–18. 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00121>.
- BOWDEN, T. J. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 25, n.4, p. 373-383. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.017>.
- BOWYER, P. H.; EL-HAROON, E. R.; HASSAAN, M.; SALIM, H.; DAVIES, S. J. Dietary nucleotides enhance growth performance, feed efficiency and intestinal functional topography in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Research*, v.50, p.1921–1930. 2019. <https://doi.org/10.1111/are.14078>.

CAO, J.; LIU, Z.; ZHANG, D.; GUO, F.; GAO, F.; WANF, M.; YI, M.; LU, M. Distribution and localization of *Streptococcus agalactiae* in different tissues of artificially infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.546, p.737370. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737370>.

CAIN, K. D.; JONES, D. R.; RAISON, R. L. Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. *Fish and Shellfish Immunology*, v.10, p.651– 666. 2000. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0280>

CARVER, J.D., WALKER, W.A. The role of nucleotides in human nutrition. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.6, p.58-72. 1995. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(94\)00019-I](https://doi.org/10.1016/0955-2863(94)00019-I).

CARVER J.D. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Paediatrica Supplement*, v.88, p.83–88. 1999.

CHENG, Z., BUENTELLO, A., GATLIN, D.M., 3rd. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.30, p.143-147. 2011.

COUTTEAU, P. Functional feed additives to prevent disease in farmed shrimp. *Aquafeed Advances in Processing and Formulation*, v.7, n.4, p.24-27. 2016.

De LIMA, S. A.; PDREIRA, A. C. O.; De FREITAS, J. M. A.; DALMASO, A. C. S.; CHIELLA, R. J.; MEURER, F.; ROMÃO, S.; BOMBARDELLI, R. A. Diets containing purified nucleotides reduce oxidative stress, interfere with reproduction, and promote growth in Nile tilapia females. *Aquaculture*, v.528, p.735509. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735509>.

DING, Z, H.; HONG, J.M.; GUO, W. L.; LI, G. H.; ZHAO, Z. C.; ZHOU, Y.; WANG, S. F.; SUN, Y.; LI, J. L.; ZHANG, D. D.; ZHOU, Y.C. The screen herbal immunopotentiator and research on its effect on the innate immune system and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, v.541, p.736778. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736778>.

DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J.; METEOS-VIVAS, M.; RODRÍGUEZGONZALO, E.; GARCÍA-GÓMEZ, D.; BUSTAMANTE-RANGEL, M.; ZAMARREÑO, M. M. D.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Determination of nucleosides and nucleotides in food samples by using liquid chromatography and capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v.92, p.12-31. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.04.005>

FALCINELLI, S.; RANDAZZO, B.; ABÚNDEZ, J. A. V.; CANGIOTTI, G. OLIVOTTO, I.; CARNEVALI, O. *Kluyveromyces fragilis* RNA extract supplementation promotes growth, modulates stress and inflammatory response in zebrafish. *Aquaculture Research*, v.49, p.1521-1534. 2018. <https://doi.org/10.1111/are.13607>.

FEGAN, D. E. Functional foods for aquaculture: benefits of Nupro and dietary nucleotides in aquaculture feeds. In T. P. Lyons, K. A. Jacques, & J. M. Hower (Eds.), *Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium* (pp. 419–432). Nottingham, UK: Nottingham University Press. 2006.

FEROSEKHAN, S.; GUPTA, S.; SINGH, A. R.; RATHER, M. A.; KUMARI, R.; KOTHARI, D. C.; PAL, A. K.; JADHAO, S. B. RNA-Loaded Chitosan Nanoparticles for

Enhanced Growth, Immunostimulation and Disease Resistance in Fish, *Currente Nanoscience*, v.10, p.453-464. 2014. <https://doi.org/10.2174/1573413710666140115220300>.

HOLLAND, M. C.; LAMBRIS, J. D. The complement system of teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, v.12, p.399–420. 2002. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0408>.

HASSAAN, M. S., EL-SAYED, A. I. M., SOLTAN, M. A., IRAQI, M. M., GODA, A., DAVIES, S. J., EL-HAROUN, E. R.; RAMADAN, H. A. Partial dietary fish meal replacement with cotton seed meal and supplementation with exogenous protease alters growth, feed performance, hematological indices and associated gene expression markers (GH, IGF-I) for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.503, p.282–292. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.009>.

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

IRIANTO A, AUSTIN B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease*, v.26, n.1, p.59–62. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00414.x>.

IWAMA, G.K. PICKERING, A.D. SUMPTER, J.P. SCHRECK, C.B. Fish Stress and Health in Aquaculture, Cambridge University Press, 2011.

JARVA H.; JOKIRANTA T. S.; WURZNER R.; MERI S. Complement resistance mechanism of Streptococci. *Molecular immunology*, v.40, p.95-107, 2003.

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

KREUTZ, L. C.; PIETRETTI, D.; DOMENICO, J. di. Imunoestimulantes para uso na aquicultura. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; CUNHA, M. A. Farmacologia aplicada a aquicultura. Santa Maria, RS: Ed, UFSM. 2017.

LEAL, C. A. G.; QUEIROZ, G. A.; PEREIRA, F. L.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. *Streptococcus agalactiae* Sequence Type 283 in Farmed Fish, Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 25, n. 4, p. 776-779. 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2504.180543>.

LEIRA, M. H.; LAGO, A. A.; VIANA, J. A.; CUNHA, L. T.; MENDONÇA, F. G.; FREITAS, R. T. F. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. *Nutri time*, v.14, n.2, p.4982-4996. 2017.

LI, P.; GATLIN, D. M. Evaluation of the prebiotic GroBiotic (R)-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M-saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture*, v.248, p.197–205. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.005>.

LI, P.; GATLIN, D. M. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture*, v.251, p.141–152. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.009>

- Lin, Y.H., Wang, H., Shiau, S.Y. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture Nutrition*, v.15, p.117-122. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00561.x>.
- LONGHI, E.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E. Avaliação da eficácia de vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Semina: Ciências Agrárias*, v.33, n.2, p. 3191-3200. 2012.
- MAGNADOTTIR, B.; LANGE, S.; GUDMUNDSDOTTIR, S.; BOGWALD, J.; DALMO, R. A. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v.19, p.429–439. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.010>.
- MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* v.20, p.137–151. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>.
- MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. *Journal of Marine Biotechnology*, v.12, p.361–379. 2010. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>.
- MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; MARINHO-NETO, F. A. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.16, n.2, p. 165-169. 2017.
- MATEO, C. D. Aspects of Nucleotide Nutrition in Pigs, PhD Dissertation. South Dakota State University, Brookings. 2005.
- MATLALA, M.P., KPUNDEH, M.D., YUAN, Y., Production and marketing systems of farmed tilapia in China. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, v.5, n.2, p.12–18. 2013.
- MIAN, G.F., GODOY, D.T., LEAL, C.A.G., YUHARA, T.Y., COSTA, G.M., FIGUEIREDO, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, v.136, p.180–183. 2009.
- MICHAEL, E. T., AMOS, S. O.; HUSSAINI, L.T. A review on probiotics application in aquaculture. *Fisheries and Aquaculture Journal*, v.5, n.4, p.1000111. 2014. <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000111>
- NAKANISHI T.; KIRYU I.; OTOTAKE M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine*, v.20, p.3764-3769, 2002.
- NICOLAS JL, GATESOUBE F-J, FROUELI S, BACHERE E, GUEGUEN Y. Quelles strategies alternatives aux antibiotiques en aquaculture? *INRA Production Animales*, v.20, n.3, p.253–258. 2007. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2007.20.3.3465>.
- NGUYEN, T.N., DAVIS, D.A., SAOUD, I.P. Evaluation of alternative protein sources to replace fish meal in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis* spp. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.40, p.113–121. 2009.
- NÄSLUND, E.; HELLSTRÖM, P. M. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiology & Behavior*, v.92, n.1-2, p.256–262. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.017>.

RODRÍGUEZ-ESTRADA, U.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Aditivos funcionais nas rações para aquicultura. In Biotecnologia e sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: ABRAPOA. 504p. 2019.

OLIVA-TELES A. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, v.35, n.2, p.83-108. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>.

PALTI, Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental and Comparative Immunology*, v.35, n.12, p. 1263-1272. 2011.

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

SACCHETIN, P. S. C.; MORAES, A. M.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. *Quimica Nova*, v.33, n.2, p.263-268. 2010.

SAKAI, D. K. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease*, v.2, p.223–247. 1992. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90065-6](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90065-6).

SAKO H. In vitro and in vivo susceptibility of *Streptococcus iniae*, isolated from diseased fish, to antimicrobial agent. *Aquaculture Science*, v.41, p.397-404, 1993.

SECOMBES, C. J. Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish and Shellfish Immunology*, v.25, p.409–416. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.05.001>.

SELIM, K. M.; REDA, R. M.; MAHMOUD, R.; EL-ARABY, I. E. Effects of nucleotides supplemented diets on growth performance and expressions of ghrelin and insulin-like growth factor genes in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, v.32, n.2, p.157-174. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/10454438.2019.1696911>.

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

SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine*, v.67, n.2-3, p.117-124. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.11.004>

TACON, A. G. J. Global Trends in Aquaculture and Compound Aquafeed Production. *World Aquaculture*. 2018.

TAN, S.; LIN, Y.; FOO, K.; KOH, H. F.; TOW, C.; ZHANG, Y.; ANG, L. W.; CUI, L.; BADARUDDIN, H.; OOI, P. L.; LIN, R. T. P; CUTTER, J. Group B *Streptococcus* Serotype III Sequence Type 283 Bacteremia Associated with Consumption of Raw Fish, Singapore. *Emerging Infectious Diseases*, v.22, n.1, p.1970-1973. 2016. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160210>.

TIBBETS, G. W. 2002. Nucleotides from yeast extract: potential to replace animal protein sources in food animal diets. Pages 435-443 in Nutritional Biotechnology in the Food and Feed Industries. Proc. Alltech's 18th Annual Symposium. T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina*, v.56, n.10, p.486–503. 2011. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>

WADE, O. W.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. *Reviews in Fisheries Science*, v.10, n.3-4, p.465-498. 2002. <https://doi.org/10.1080/20026491051758>

WANG Y-B, LI J-R, LIN J. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, v.281, p.1–4. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.002>.

WANG, M., LU, M. X. Tilapia polyculture: a global review. *Aquaculture Research*, v.47, p.2363–2374. 2016. <https://doi.org/10.1111/are.12708>.

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

WILKINS, C.; GALE, M. Recognition of viruses by cytoplasmatic sensors. *Current Opinion in Immunology*, v. 22, n.1, p.41-47. 2010.

WHITTINGTON, R. J.; MUNDAY, B. L.; AKHLAGHI, M. REDDACLIFF, G. L.; CARSON, J. Humoral and peritoneal cell responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to ovalbumin, *Vibrio anguillarum* and Freund's complete adjuvant following intraperitoneal and bath immunisation. *Fish and Shellfish Immunology*, v.4, p.475–488. 1994. <https://doi.org/10.1006/fsim.1994.1042>.

XU, L.; RAN, C.; HE, S.; ZHANG, J.; HU, J.; YANG, Y.; DU, Z.; YANG, Y.; ZHOU, Z. Effects of dietary yeast nucleotides on growth, non-specific immunity, intestine growth and intestinal microbiota of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ x *Oreochromis aureus* ♂. *Animal Nutrition*, v.1, p.244-251. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.006>

ZAPATA, A.; DIEZ, B.; CEJALVO, T.; GUTIERREZ-DE FRIAS, C.; CORTES, A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v.20, n.2, p.126–136. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>.

DESEMPENHO E CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADA COM NUCLEOTÍDEOS E DESAFIADAS CONTRA *Streptococcus agalactiae* NÃO TIPÁVEL

Introdução

A criação intensiva de peixes é recente, com isso, os animais ainda não tiveram o período necessário de evolução e adaptação ao ambiente de confinamento característico deste tipo de criação, encontrando-se na maioria das vezes em estresse constante ou crônico, tornando-se alvo de patógenos, como parasitos, bactérias e vírus (KREUTZ et al., 2017).

Para manutenção da saúde dos peixes de produção, uma estratégia que pode ser adotada consiste na administração de imunomoduladores em suas dietas com o objetivo de estimular os mecanismos não específicos de defesa (SAKAI, 1999). A adoção dos protocolos de imunomodulação para peixes permite maximizar a sua proteção em situações de estresse, evitando o estabelecimento de doenças na criação, contribuindo para melhorar o desempenho produtivo e a sobrevivência dos animais, o que consequentemente reduzirá as perdas econômicas no processo produtivo.

Os efeitos benéficos dos imunomoduladores consistem em aumentar a atividade dos macrófagos, a fagocitose por neutrófilos e monócitos e maior produção de linfócitos, imunoglobulinas e atividade da lisozima (SAKAI, 1999), além de estimular o crescimento e/ou a atividade de bactérias benéficas do trato gastrointestinal do hospedeiro (GIBSON & ROBERFROID, 1995), com otimização da superfície de absorção intestinal (SILVA & NÖRNBERG, 2003).

Dentre os imunomoduladores que merecem destaque na aquicultura encontram-se os nucleotídeos, compostos formados por uma base nitrogenada, um monossacarídeo pentose e um, dois ou três grupos fosfatos (CHAMPE & HARVEY, 1996). Eles possuem funções fisiológicas e bioquímicas essenciais, que incluem numerosas reações de transferência de grupos fosfatos, tanto do ATP como de outros nucleotídeos trifosfatos, que suprem as reações endergônicas, atuando também na formação de inúmeras coenzimas, tais como flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP), coenzima A e S-adenosil-metionina e como efetores alostéricos e agonistas celulares (CARVER & WALKER, 1995; COSGROVE, 1998).

Os efeitos benéficos da suplementação de nucleotídeos na dieta estão relacionados com o crescimento, metabolismo de lipídios, funções hepáticas, na maturação, ativação e proliferação de linfócitos, assim como na fagocitose de macrófagos e expressão gênica de certas citocinas. López-Navarro et al. (1995) relataram que os nucleotídeos dietéticos são responsáveis por modular o metabolismo dos nucleotídeos do fígado, e que este é o órgão mais importante para estocagem de nucleotídeos e transporte interórgãos visando atender as necessidades fisiológicas do organismo (LI et al., 2007).

Estudos realizados com a suplementação dietética de nucleotídeos em animais aquáticos têm demonstrado melhoria no desempenho produtivo, reposta imunológica e resistência às doenças (REDA et al., 2018). A imunonutrição pode ser uma importante ferramenta na prevenção de doenças, como observado no robalo híbrido desafiado contra *Streptococcus agalactiae*. SHIAU et al. (2015) sugerem que a suplementação de 120 a 240 mg kg⁻¹ de nucleotídeos na dieta aumenta a resposta imune e a sobrevivência de tilápia híbrida (*O. niloticus* × *O. aureus*) desafiada contra *Streptococcus iniae*.

Assim, com todos os benefícios relatados na literatura com o uso de nucleotídeos na dieta de peixes, este estudo teve por objetivo avaliar o potencial imunomodulador do Biotide Extra® incluso na dieta de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) desafiadas por coabitação com *Streptococcus agalactiae* sorotipo não tipável.

Materiais e métodos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal em parceria com o Laboratório de Anatomia Animal da FCAV-Unesp de Jaboticabal.

O protocolo utilizado neste experimento está de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado em 11 de abril de 2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP protocolo nº 004605/19.

Delineamento experimental

Foram utilizados 700 juvenis de tilápia-do-Nilo provenientes de piscicultura comercial, com peso aproximado de $81,75 \pm 3,08$ g. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 20 unidades experimentais de 450 L, com aeração constante e sistema de abastecimento de água independente e com fluxo contínuo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três níveis (37, 75 e 150 mg kg⁻¹) de suplementação de RNA, como fonte de nucleotídeos dietético, uma dieta controle (sem adição de RNA) e cinco repetições.

Após o período de aclimação, iniciou-se a alimentação com as dietas experimentais, fornecida a 3,0% do peso vivo parcelada em três vezes ao dia (9h00, 13h00 e 17h00), por um período de 30 dias. Uma amostra inicial de dois peixes de cada tratamento foi utilizada para as análises hematológicas, composição corporal e de densidade mineral óssea (DMO). Os peixes amostrados para as análises (com exceção dos que foram para a DMO, os quais retornaram as respectivas unidades experimentais) foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico em solução alcoólica de benzocaína (100 mg L⁻¹).

Durante todo o período experimental as variáveis limnológicas da água foram monitoradas. A temperatura ($28,68 \pm 0,90^{\circ}\text{C}$) foi monitorada diariamente pela manhã e à tarde com auxílio de termômetro digital. O pH ($7,51 \pm 0,13$), oxigênio dissolvido ($2,63 \pm 0,70$ mg L⁻¹) e a condutividade elétrica ($171,01 \pm 2,23$ $\mu\text{S cm}^{-1}$) foram monitoradas semanalmente com sonda multiparâmetro (AKSO modelo AK88).

Dieta experimental

Foi utilizada uma ração comercial farelada (LAGUNA Tilápia 32) com suplementação vitamínica e mineral completa (Tabela 1). Para o processamento, foi adicionado à ração 2% de óleo vegetal e suplementada com 0, 37, 75 e 150 mg kg⁻¹ de RNA extraído do conteúdo citoplasmático de *Saccharomyces cerevisiae*, como fonte de nucleotídeos (Biotide Extra®, Biorigin, Brasil) e, homogeneizada mecanicamente para o processamento. A mistura na ração foi preparada no Laboratório de Nutrição e Saúde de Organismos Aquáticos (AQUANUTRI), da Unesp, Campus de Botucatu e extrusada em extrusora Ex-Micro®, seca em estufa de ventilação forçada a 55°C por 24 horas e, após resfriamento, acondicionada em sacos e armazenada sob refrigeração até o fornecimento aos peixes. As dietas foram submetidas a análise de composição

química no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da UNESP, campus de Jaboticabal, para determinação da proteína bruta, extrato etéreo, energia bruta, fibra bruta e matéria mineral.

Tabela 2 - Composição química da ração analisada com base na matéria seca.

	Controle	37 mg kg ⁻¹	75 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹
Proteína bruta (%)	34,95	34,92	34,70	35,05
Energia bruta (kcal)	3462	3310	3556	3562
Etrato etéreo (%)	10,06	10,62	9,99	10,30
Fibra bruta (%)	4,82	4,15	4,28	5,10
Matéria mineral (%)	12,67	12,54	12,49	12,96

Desempenho produtivo

Foram realizadas biometrias com 0, 15 e 30 dias dentro do período de experimentação. Os valores obtidos nas biometrias foram tabulados para obter os dados de desempenho produtivo:

$$\text{Peso Final Médio (g): } PFM = \frac{\text{Peso final}}{\text{número de indivíduos}};$$

$$\text{Comprimento Final Médio (cm): } CFM = \frac{\text{Comprimento final}}{\text{número de indivíduos}};$$

$$\text{Ganho em Peso (g): } GP = \text{Peso Final} - \text{Peso Inicial};$$

$$\text{Conversão Alimentar Aparente: } CAA = \frac{\text{alimento fornecido (g)}}{\text{ganho em peso (g)}};$$

$$\text{Sobrevivência (%): } SOB = 100 \times \frac{\text{Número inicial de indivíduos}}{\text{Número final de indivíduos}};$$

Amostragem para colheita de sangue

Foram realizadas amostragens nos dias 0, 15 e 30 dias após o início do fornecimento das dietas experimentais e, 3, 6 e 24 horas após o desafio bacteriano com a bactéria *Streptococcus agalactiae* sorotipo não tipável inativada. Em cada tempo de amostragem, 10 peixes de cada tratamento, por coleta, foram anestesiados (solução alcoólica de benzocaína, 50 mg L⁻¹) e submetidos, à colheita de sangue por punção do vaso caudal com seringa sem anticoagulante.

Análises hematológicas

Uma alíquota de 0,3 ml de sangue foi acondicionada em microtubo de polipropileno contendo heparina, para a realização do hemograma e da atividade respiratória de leucócitos. Para a determinação dos parâmetros eritrocitários, a contagem do número de eritrócitos foi realizada em câmara Neubauer, utilizando-se solução formol-citrato segundo Ranzani-Paiva et al. (2013).

O hematócrito foi realizado seguindo a metodologia do microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). A determinação da quantidade de hemoglobina presente no sangue foi determinada através do método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944). As equações hematimétricas foram calculadas de acordo com Wintrobe (1934) para a determinação do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

O restante do sangue foi acondicionado em microtubos de polipropileno isento de anticoagulante, homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 120 min para coagulação, posteriormente centrifugado sob refrigeração durante 10 minutos (3.000G a 4°C) separando-se o soro para posterior análises.

Análises bioquímicas

No soro, foram avaliadas a glicose sanguínea, o cortisol, proteínas totais e albumina. A concentração de glicose foi mensurada pelo método de Trinder, as proteínas totais pelo método de biureto e albumina pelo método de bromocresol, utilizando-se kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Os valores de globulina foram obtidos através do cálculo diferencial e a relação albumina:globulina calculada a partir das concentrações de albumina e globulina. Os valores para o cortisol foram obtidos por imunoensaio enzimático utilizando kit DRG Cortisol ELISA (DRG Instruments GmbH, Germany).

Atividade enzimática (AST e ALT)

A atividade sérica das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram aferidas por kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil) utilizando-se metodologia cinética UV-IFCC com comprimento de onda 340nm.

Atividade respiratória leucócitos

A produção de espécies reativas de oxigênio foi mensurada utilizando NBT (cloreto de nitrotetrazóliol, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil; # N6876), seguindo o protocolo de Sahoo et al. (2005). Imediatamente após a colheita do sangue, 100 µL de sangue heparinizado foram incubados com um volume igual de tampão NBT (0,2%) à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, 1 mL de dimetilformamida (DMF, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil; # 227056) foi adicionado às amostras e, lidas em espectrofotômetro (Modelo Genesys 10S, Thermo Scientific Inc., Madison, WI, EUA) com comprimento de onda de 540 nm, à temperatura ambiente.

Atividade da lisozima

A concentração da lisozima foi determinada segundo metodologia proposta por Ellis (1990), modificada por Abreu (2009) e Biller-Takahashi et al (2013). Para tanto, 50 µL de soro foi adicionado a 75 µL de tampão fosfato monobásico (lysozyme - Sigma-Aldrich, Germany), posteriormente 100 µL de solução contendo *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg mL⁻¹) foi misturada e lida imediatamente em leitor de microplacas ELISA (ThermoPlate Reader MN) e medida pela redução da absorbância da solução à 450 nm a cada cinco minutos, durante dez minutos.

Composição corporal

Os peixes foram submetidos à análise de composição corporal e densitometria óssea no aparelho de absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal em três etapas: antes da alimentação com a dieta experimental, ao final de 30 dias de alimentação com a dieta experimental e sete dias após o desafio bacteriano.

Antes do escaneamento, o DXA (Hologic® (Hologic Delphi QDR, Hologic Discovery QDR, Bedford, MA, USA) foi calibrado com um phantom (modelo similar às vértebras, fornecido pelo fabricante). Os animais foram pesados e mensurados quanto ao comprimento com fita métrica comum milimetrada e, em seguida, anestesiados com benzocaína (50 mg L⁻¹).

Após à perda dos reflexos, cada peixe foi posicionado em decúbito lateral na plataforma do densitômetro Hologic, Discovery Si. para realização de uma varredura no modo corpo total com área definida de acordo com o tamanho do animal. Após leitura de dados em software *small animal* do equipamento, foi obtida a porcentagem de gordura (%), quantidade de gordura (g), densidade mineral óssea (g/cm²), conteúdo mineral ósseo (g) e porcentagem de massa magra (%).

Desafio bacteriano

Um dia após a última coleta (dia 31), 24 peixes de cada tratamento com quatro repetições foram avaliados quanto à sua resistência contra *Streptococcus agalactiae* não tipável após infecção experimental, na dose $9,1 \times 10^8$ UFC, estabelecida previamente em ensaio de DL50%, por coabitação na proporção de 1:1,2 (infectados: não infectados). Os peixes “troianos” foram infectados com *S. agalactiae* à 1% do peso vivo por injeção na região intraperitoneal. A cepa bacteriana utilizada, proveniente da própria coleção do LAPOA, isolada de tilápia-do-Nilo (cepa d115c), identificadas por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (número de acesso do GenBank KU605571.1), cultivada em meio TBS (Tripic Soy Broth, Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubada a 28°C por 24 horas em estufa de crescimento, foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a $3.000 \times g$ em centrífuga refrigerada modelo Eppendorf 5804 R. As células bacterianas foram lavadas duas vezes com tampão PBS (0,01 M) sob as mesmas condições e suspenso no mesmo tampão. Foram avaliados o comportamento e os sinais clínicos, além de mortalidade diária durante 20 dias após a infecção. Peixes recém-mortos de cada tratamento foram utilizados para reisolamento bacteriano a partir do rim e cérebro para confirmação da infecção pela bactéria.

Desafio com a bactéria inativa

A mesma bactéria utilizada no desafio anterior foi novamente utilizada, todavia, inativada para estimular o sistema imunológico das tilápias e evitar mortalidade. A bactéria foi inativada através de banho-maria à 56° (Inbras ALB 250S) por 30 min e, após resfriamento à temperatura ambiente, inoculada na cavidade celomática de 30 peixes por grupo na dose previamente determinada pela DL50.

Antes, 3, 6 e 24 horas após o desafio, o sangue, colhido por punção do vaso caudal, de 10 peixes por grupo para realização das análises hematológicas e imunológicas como descrito anteriormente.

Análise estatística

As análises de variância (ANOVA) com 3 fatores longitudinais foram realizadas pelo teste de média PROC MIXED e, para os tratamentos utilizou-se o teste de comparação múltipla de médias Tukey, adotando $\alpha=0,05$ de significância, através do software Statistical Analysis System (SAS® v.9.3). A análise de sobrevivência Kaplan-Meier foi realizada através do software SigmaStat 3.5.

Resultados e Discussão

Desempenho produtivo

Não houve influência da suplementação com nucleotídeos dietéticos ($p>0,05$) para os parâmetros de comprimento final (CF), peso final (PF), ganho em peso diário (GPD), conversão alimentar aparente (CAA) e sobrevivência (SOB) (Tabela 3).

Tabela 3 – ANOVA One-Way para desempenho produtivo de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos.

	C	37 mg kg ⁻¹	75 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹	p-valor
CI ¹ (cm)	16,64 ± 0,19	16,61 ± 0,16	16,59 ± 0,16	16,53 ± 0,16	0,76
CF ² (cm)	19,27 ± 0,62	19,17 ± 0,63	19,57 ± 0,40	19,44 ± 0,55	0,67
PI ³ (g)	82,73 ± 3,73	81,09 ± 2,36	82,11 ± 3,43	81,08 ± 2,81	0,80
PF ⁴ (g)	124,66 ± 13,19	122,76 ± 12,01	131,45 ± 7,74	127,46 ± 9,74	0,62
GPD ⁵ (g)	1,11 ± 0,35	1,06 ± 0,31	1,31 ± 0,40	1,29 ± 0,30	0,58
CAA ⁶	2,24 ± 0,47	2,26 ± 0,49	2,09 ± 0,36	2,04 ± 0,31	0,79
SOB ⁷ (%)	99,38 ± 1,40	99,38 ± 1,40	99,38 ± 1,40	100 ± 0,00	0,80

¹CI: comprimento inicial (cm); ²CF: comprimento final (cm); ³PI: peso inicial (g); ⁴PF: peso final (g); ⁵GPD: ganho em peso diário (g); ⁶CAA: conversão alimentar aparente; ⁷SOB: sobrevivência (%).

Para $p > 0,05$ não há diferença significativa.

Hematologia

Os parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo apresentaram diferença significativa entre os tempos de amostragens pelo teste de médias PROC MIXED com três fatores longitudinais (três tempos durante a alimentação e três tempos após o desafio bacteriano), contudo, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4).

A porcentagem de hemoglobina apresentou menor valor aos 15 e 30 dias de experimento e, após o desafio ela apresentou maior valor com 24h. Ainda após o desafio, o tratamento controle apresentou maior valor para hemoglobina e o menor valor foi apresentado para 75 mg kg⁻¹ de nucleotídeos. O VCM não apresentou diferença significativa durante o período de alimentação e, com 24h após o desafio bacteriano apresentou um aumento, sem diferença entre os tratamentos. O HCM não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, contudo apresentou uma redução aos 15 e 30 dias de alimentação e, após 24 horas do desafio apresentou valor próximo ao tempo zero. O CHCM não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, mas apresentou uma redução com 15 dias de alimentação, estabilizou com 30 dias, 3 e 6 horas após à inoculação da bactéria inativada e com 24 horas apresentou valor próximo ao inicial.

Tabela 4 – Parâmetros hematológicos de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementada com nucleotídeos e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

	FL ¹	Níveis de inclusão				Geral	Efeito	p-valor
		0 mg kg ⁻¹	37 mg.kg ⁻¹	75 mg.kg ⁻¹	150 mg.kg ⁻¹			
Hemoglobina (g/dL)	0d	6,591	7,023	6,114	7,172	6,725A	Trat.	0,457
	15d	5,254	5,362	5,186	5,876	5,420B	Fat. Long.	<,0001
	30d	5,759	5,022	5,858	5,416	5,514B	Int. (TRxFL)	0,265
	Geral	6,043	5,881	5,754	5,941			
	Após desafio							
	3h	5,434	5,143	4,897	5,040	5,128B	Trat.	0,054
	6h	5,427	5,423	5,276	5,303	5,357B	Fat. Long.	<,0001
	24h	7,657	7,568	6,917	7,587	7,432A	Int. (TRxFL)	0,667
	Geral	6,172a	6,045ab	5,697b	5,977ab			
	Após desafio							
VCM (fL)	0d	184,19	185,01	165,86	164,08	174,79	Trat.	0,234
	15d	177,54	174,26	167,21	174,83	173,46	Fat. Long.	0,466
	30d	179,22	169,04	162,49	158,47	167,30	Int. (TRxFL)	0,919
	Geral	180,32	176,10	165,19	165,79			
	Após desafio							
	3h	151,40	172,45	155,33	159,13	159,08B	Trat.	0,776
	6h	157,78	167,68	171,79	159,32	164,14B	Fat. Long.	0,0009
	24h	186,08	180,50	177,34	187,23	182,79A	Int. (TRxFL)	0,717
	Geral	165,09	173,54	167,49	168,56			

HCM (pg)	0d	45,749	45,304	40,656	45,573	44,321A	Trat.	0,369
	15d	29,025	29,017	27,718	29,604	28,842B	Fat. Long.	<,0001
	30d	32,765	31,264	29,699	29,220	30,737B	Int. (TRxFL)	0,719
	Geral	35,847	35,195	32,691	34,798			
	Após desafio							
	3h	30,416	31,588	29,647	31,326	30,744B	Trat.	0,376
CHCM (g.dL ⁻¹)	6h	32,407	32,680	32,261	32,072	32,355B	Fat. Long.	<,0001
	24h	42,224	41,219	38,906	44,454	41,701A	Int. (TRxFL)	0,676
	Geral	35,016	35,162	33,605	35,951			
	0d	24,764	24,451	24,565	27,578	25,340A	Trat.	0,243
	15d	16,467	16,691	16,609	17,295	16,766C	Fat. Long.	<,0001
	30d	18,431	18,666	18,378	18,326	18,450B	Int. (TRxFL)	0,578
	Geral	19,888	19,936	19,851	21,067			
	Após desafio							
	3h	20,265	19,184	19,319	19,890	19,665B	Trat.	0,340
	6h	19,150	19,731	18,817	20,265	19,491B	Fat. Long.	<,0001
	24h	22,740	23,088	22,124	23,885	22,959A	Int. (TRxFL)	0,937
	Geral	20,718	20,668	20,087	21,347			

¹FL Fator longitudinal em dias para o período de alimentação e em horas após o desafio bacteriano. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($\alpha=0,05$).

Análises bioquímicas

A concentração de proteína teve um aumento significativo com 15 dias de alimentação, contudo não houve diferença significativa entre os tratamentos. Após o desafio, a concentração de proteína foi maior após 3h, porém também não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 4).

Para albumina não houve diferença significativa durante o período de alimentação como também para os tratamentos. Após o desafio, houve um aumento da concentração de albumina até às 24h, contudo sem diferença entre os tratamentos. A globulina apresentou redução durante o período experimental e foi maior com 24h após o desafio bacteriano, contudo não houve diferença significativa entre os tratamentos. A proporção albumina:globulina não apresentou diferença durante o período experimental e foi maior com 24h após o desafio bacteriano (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos da tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

	FL ¹	Níveis de inclusão				Geral	Efeito	p-valor
		0 mg kg ⁻¹	37 mg kg ⁻¹	75 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹			
Proteína (g.dL ⁻¹)	0d	2,697	2,496	2,678	2,672	2,636B	Trat.	0,698
	15d	3,182	3,225	3,106	3,083	3,149A	Fat. Long.	<,0001
	30d	2,978	2,765	2,675	2,823	2,810B	Int. (TRxFL)	0,607
	Geral	2,952	2,829	2,819	2,859			

		Após desafio						
Albumina (g/dL ⁻¹)	3h	3,073	3,194	2,974	3,037	3,642A	Trat.	0,326
	6h	3,077	3,376	3,163	3,223	3,070B	Fat. Long.	<,0001
	24h	3,780	3,699	3,521	3,568	3,210B	Int. (TRxFL)	0,835
	Geral	3,310	3,423	3,219	3,276			
	0d	0,656	0,758	0,628	0,648	0,672	Trat.	0,755
	15d	0,690	0,725	0,794	0,694	0,726	Fat. Long.	0,215
	30d	0,653	0,658	0,737	0,668	0,679	Int. (TRxFL)	0,868
	Geral	0,666	0,713	0,720	0,670			
	Após desafio							
	3h	0,582	0,574	0,569	0,587	0,578C	Trat.	0,467
Globulina (g.dL ⁻¹)	6h	0,656	0,632	0,651	0,637	0,644B	Fat. Long.	<,0001
	24h	0,863	0,827	0,744	0,863	0,824A	Int. (TRxFL)	0,740
	Geral	0,701	0,678	0,654	0,696			
	0d	2,491	2,620	2,427	2,449	2,497B	Trat.	0,296
	15d	2,472	2,807	2,642	2,649	2,642AB	Fat. Long.	<,0001
	30d	2,919	2,878	2,798	2,675	2,817A	Int. (TRxFL)	0,126
	Geral	2,295	2,161	2,130	2,201			
	Após desafio							
	3h	2,491	2,620	2,412	2,449	2,493	Trat.	0,430
	6h	5,418	2,807	2,642	2,649	3,379	Fat. Long.	0,005
Albumina:Globulina	24h	2,917	2,876	2,787	2,678	2,815	Int. (TRxFL)	0,759
	Geral	2,627	2,768	2,622	2,591			
	0d	33,112	33,799	32,246	32,420	32,894	Trat.	0,090
	15d	27,747	29,442	34,269	29,057	30,129	Fat. Long.	0,329
	30d	26,770	32,374	38,996	29,663	31,951	Int. (TRxFL)	0,462
	Geral	29,210	31,872	35,170	30,380			
	Após desafio							
	3h	24,632	22,227	23,668	24,142	23,667B	Trat.	0,190
	6h	27,719	22,906	26,521	24,965	25,528B	Fat. Long.	0,0005
	24h	29,960	29,042	27,103	35,120	30,306A	Int. (TRxFL)	0,417
	Geral	27,437	24,725	25,764	28,076			

¹FL Fator longitudinal em dias para o período de alimentação e em horas após o desafio bacteriano.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($\alpha=0,05$).

A glicose sanguínea apresentou o maior valor com 15 dias de alimentação e após 30 dias de alimentação houve redução em sua concentração, contudo sem diferença entre os tratamentos. Após o desafio bacteriano, os maiores valores foram observados em 3 e 6 horas após o desafio. Após 24 horas do desafio a glicose apresentou uma redução, contudo sem diferença entre os tratamentos (Tabela 6). Os peixes apresentaram aumento no cortisol durante o período de alimentação, contudo sem diferença entre os tratamentos. Em três horas após o desafio bacteriano, os peixes que receberam 150 mg kg⁻¹ de nucleotídeos apresentaram um menor valor para o cortisol,

sendo o maior valor apresentado pelo tratamento controle e, os demais fatores não apresentaram diferença significativa.

Tabela 6 - Concentração de glicose e cortisol para tilápia-do-Nilo durante o período experimental e após o desafio bacteriano.

	FL ¹	TR				Geral	Efeito	p-valor
		C	37 mg kg ⁻¹	75 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹			
Glicose (mg L ⁻¹)	0d	22,950	21,943	28,163	21,369	23,606C	Trat.	0,392
	15d	55,208	54,987	58,828	58,516	56,810A	Fat. Long.	<,0001
	30d	35,538	39,350	49,271	38,254	40,603B	Int. (TRxFL)	0,927
	Geral	37,899	38,660	45,421	39,380			
	Após desafio							
	3h	72,214	81,510	84,717	79,141	79,395A	Trat.	0,931
	6h	67,551	69,974	75,979	67,275	70,195A	Fat. Long.	0,006
	24h	64,167	62,541	54,806	62,370	60,971B	Int. (TRxFL)	0,692
	Geral	67,977	71,342	71,834	69,595			
	Após desafio							
Cortisol (ng L ⁻¹)	0d	59,51	58,53	36,51	67,07	55,40B	Trat.	0,912
	15d	166,69	171,25	166,50	209,09	178,10A	Fat. Long.	0,003
	30d	181,26	117,15	189,41	144,30	158,03A	Int. (TRxFL)	0,793
	Geral	135,82	115,60	130,48	140,15			
	Após desafio							
	3h	370,33a	260,43ab	184,72ab	180,02b	248,87	Trat.	0,682
	6h	191,27	243,03	177,53	218,85	207,67	Fat. Long.	0,512
	24h	182,54	234,89	318,75	180,91	229,28	Int. (TRxFL)	0,018
	Geral	248,05	246,12	227,00	193,26			
	Após desafio							

¹FL Fator longitudinal em dias para o período de alimentação e em horas após o desafio bacteriano.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($\alpha=0,05$).

Atividade enzimática

Durante o período experimental, a atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) apresentou redução no último período de alimentação, não apresentando diferença entre a coleta inicial e com 15 dias de alimentação, assim como entre os tratamentos. Após o desafio bacteriano, os valores mais altos para a ALT foram observados três horas após o desafio, com redução 24 horas após o desafio, contudo sem diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4).

A atividade da aspartato aminotransferase (AST) foi menor após 30 dias de alimentação com o aditivo, enquanto com 15 dias de alimentação o tratamento controle apresentou os valores mais elevados em comparação aos demais tratamentos. Após o desafio bacteriano os valores para

esta enzima não foram diferentes entre os tratamentos, apenas entre os tempos de amostragem, com maior valor seis horas após o desafio.

Tabela 7 - Atividade alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) de tilápia-do-Nilo alimentada com dietas suplementadas com nucleotídeos e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*

	FL ¹	TR			Geral	Efeito	p-valor
		C	37 mg kg ⁻¹	75 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹		
ALT	0d	31,602	25,142	35,531	19,555	26,280A	Trat. 0,851
	15d	35,812	30,885	28,285	26,132	30,278A	Fat. Long. <,0001
	30d	9,855b	8,303b	11,035ab	18,398a	11,898B	Int. (TRxFL) 0,229
	Geral	24,829	21,443	23,641	21,362		
	Após desafio						
	3h	30,852	33,192	24,599	28,634	29,319A	Trat. 0,843
	6h	24,056	27,849	26,068	29,315	26,822AB	Fat. Long. 0,0376
	24h	15,260	19,031	27,063	12,658	18,503B	Int. (TRxFL) 0,633
	Geral	23,389	26,691	25,910	23,536		
	Após desafio						
AST	0d	198,320	155,180	114,060	144,750	153,080A	Trat. 0,098
	15d	138,930	81,019	80,073	97,492	99,377AB	Fat. Long. 0,0073
	30d	73,384ab	51,016b	42,264b	133,930a	75,148B	Int. (TRxFL) 0,181
	Geral	193,00	123,77	94,07	119,75		
	Após desafio						
	3h	42,968	42,158	44,342	50,963	45,108B	Trat. 0,181
	6h	54,217	90,797	58,054	51,245	63,578A	Fat. Long. 0,0386
	24h	44,553	75,237	50,030	59,509	57,332AB	Int. (TRxFL) 0,321
	Geral	51,546	76,944	47,417	57,724		
	Após desafio						

¹FL Fator longitudinal em dias para o período de alimentação e em horas após o desafio bacteriano, Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($\alpha=0,05$).

Atividade respiratória de leucócitos

A atividade respiratória de leucócitos (burst) apresentou uma redução aos 15 e 30 dias de alimentação, porém sem diferença ($P>0,05$) entre os níveis de inclusão do produto. Ao serem desafiados com a cepa bacteriana, os peixes que receberam dietas contendo nucleotídeo (todos os níveis de inclusão) apresentaram maior valor para o burst respiratório com três horas do desafio. E após seis horas do desafio, os peixes com o maior nível de inclusão (150 mg kg⁻¹) foram os que apresentaram maior valor para esse parâmetro (Tabela 8). Isto pode ser uma resposta do organismo (estímulo do sistema imune inato) contra a bactéria, fornecendo maior atividade das células de defesa a fim de combater a bactéria patogênica (ABREU et al., 2009).

Tabela 8 - Atividade respiratória dos leucócitos para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e após desafio bacteriano.

FL ¹	TR				Geral	Efeito	P-valor
	C	37 mg kg ⁻¹	75 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹			
0d	0,498	0,510	0,519	0,499	0,507A	Trat.	0,963
15d	0,451	0,459	0,436	0,468	0,453B	Fat. Long.	<,0001
30d	0,475	0,449	0,455	0,462	0,460B	Int. (TRxFL)	0,267
Geral	0,474	0,473	0,470	0,476			
3h	0,427 b	0,511 a	0,512 a	0,472 a	0,480	Trat.	0,995
6h	0,472 b	0,457 b	0,470 b	0,527 a	0,482	Fat. Long.	0,8883
24h	0,475	0,495	0,512	0,515	0,499	Int. (TRxFL)	0,044
Geral	0,458	0,488	0,498	0,505			

¹FL Fator longitudinal em dias para o período de alimentação e em horas após o desafio bacteriano.

Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal) não diferem entre si ($\alpha=0,05$)

Lisozima

A atividade da lisozima não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, assim como para o fator longitudinal durante o período experimental e após o desafio bacteriano (Tabela 9).

Tabela 9 - Atividade lisozima para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e após desafio bacteriano.

FL	TR				Geral	Efeito	P-valor
	C	37 mg kg ⁻¹	75 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹			
0D	693,02	582,56	616,28	697,38	647,31	Trat.	0,814
15D	937,21	755,81	719,77	661,37	768,54	Fat. Long.	0,362
30D	638,76	680,81	921,06	740,70	745,33	Int. (TRxFL)	0,532
Geral	765,33	673,06	752,37	699,82			
Após desafio							
3h	743,60	682,69	739,53	720,80	721,66	Trat.	0,453
6h	676,23	942,44	616,80	690,44	731,48	Fat. Long.	0,458
24h	874,71	985,01	891,42	616,80	841,99	Int. (TRxFL)	0,707
Geral	764,85	870,05	749,25	676,01			

¹FL Fator longitudinal em dias para o período de alimentação e em horas após o desafio bacteriano.

Composição corporal

Os valores obtidos pelo escaneamento dos peixes (Figura 9) através do DXA foram submetidos a análise de variância com dois fatores longitudinais realizados pelo teste de médias PROC MIXED utilizando software SAS® 9.3. Os resultados demonstraram diferença entre os tempos de alimentação, porém não houve diferença significativa entre os níveis do aditivo na dieta. Os peixes avaliados sete dias após o desafio não diferiram ($p>0,05$) entre o tempo, assim como para os tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise de covariância PROC MIXED para os parâmetros de composição corporal disponíveis através do DXA para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

	FL ¹	TR			Geral	Efeito	p-valor	
		C	37 mg kg ⁻¹	75 mg kg ⁻¹				150 mg kg ⁻¹
Peso (g)	0	94,05	100,74	106,30	98,47	99,99^B	Trat.	0,340
	30	142,15	136,15	151,30	137,55	141,79^A	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	118,10	118,44	129,02	118,01		Int. (TRxFL)	0,666
	Após desafio							
	30	142,15	136,15	151,30	137,55	141,79	Trat.	0,530
	37	142,98 ^a	131,85ab	116,65b	144,27a	133,94	Fat. Long.	0,115
	Geral	142,57	134,00	133,97	140,91		Int. (TRxFL)	0,023
Comprimento total (cm)	0	17,51	17,62	18,03	17,72	17,72^B	Trat.	0,431
	30	20,65	20,30	20,90	20,07	20,48^A	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	19,08	18,96	19,46	18,89		Int. (TRxFL)	0,619
	Após desafio							
	30	20,65	20,30	20,90	20,07	20,48^A	Trat.	0,292
	37	19,81 ^a	18,84ab	18,13b	19,53ab	19,08^B	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	20,23	19,57	19,51	19,80		Int. (TRxFL)	0,026
Área (cm ²)	0	24,93	27,30	27,10	26,09	26,35^B	Trat.	0,201
	30	32,19	31,30	34,88	31,21	32,40^A	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	28,56	29,30	30,99	28,65		Int. (TRxFL)	0,129
	Após desafio							
	30	32,19	31,30	34,88	31,25	32,40	Trat.	0,681
	37	34,14a	31,89ab	29,13b	33,50ab	32,16	Fat. Long.	0,790
	Geral	33,16	31,59	32,01	32,36		Int. (TRxFL)	0,008
Conteúdo Mineral	0	2,46b	2,93a	2,84ab	2,70ab	2,73^B	Trat.	0,130
	30	3,90	3,72	4,34	3,59	3,88^A	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	3,18	3,32	3,59	3,14		Int. (TRxFL)	0,017
	Após desafio							

Densidade Mineral Óssea (g/cm ²)	30	3,897	3,717	4,342	3,589	3,886	Trat.	0,649
	37	4,253	3,860	3,531	4,339	3,996	Fat. Long.	0,460
	Geral	4,075	3,788	3,936	3,964		Int. (TRxFL)	0,005
	0	0,098b	0,107a	0,104ab	0,103ab	0,103^B	Trat.	0,219
	30	0,121	0,119	0,124	0,114	0,119^A	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	0,109	0,113	0,114	0,109		Int. (TRxFL)	0,037
	Após desafio							
	30	0,12	0,12	0,12	0,11	0,12	Trat.	0,705
	37	0,12	0,12	0,12	0,13	0,12	Fat. Long.	0,057
Massa Gorda (g)	Geral	0,122	0,119	0,122	0,122		Int. (TRxFL)	0,021
	0	8,49	9,78	9,02	9,74	9,26^B	Trat.	0,648
	30	13,46	12,12	14,22	14,05	13,46^A	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	10,97	10,95	11,62	11,89		Int. (TRxFL)	0,343
	Após desafio							
	30	13,46	12,12	14,22	14,05	13,462^A	Trat.	0,752
	37	12,69	12,31	11,00	12,06	12,015^B	Fat. Long.	0,016
	Geral	13,075	12,215	12,610	13,055		Int. (TRxFL)	0,189
	Após desafio							
Massa magra + CMO ² (g)	30	132,82	128,78	142,06	126,31	132,49	Trat.	0,558
	37	135,99 ^a	124,03ab	110,00b	137,95a	126,99	Fat. Long.	0,253
	Geral	132,40	126,41	126,03	132,13		Int. (TRxFL)	0,015
	0	88,65	99,33	101,54	92,47	95,50^B	Trat.	0,271
	30	132,82	128,78	142,06	126,31	132,49^A	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	110,73	114,06	121,80	109,39		Int. (TRxFL)	0,391
	Após desafio							
	30	132,82	128,78	142,06	126,31	132,49	Trat.	0,558
	37	135,99 ^a	124,03ab	110,00b	137,95a	126,99	Fat. Long.	0,253
Massa Total (g)	Geral	132,40	126,41	126,03	132,13		Int. (TRxFL)	0,015
	0	97,16	109,13	110,54	102,20	104,76^B	Trat.	0,323
	30	146,28	140,92	156,28	140,37	145,96^A	Fat. Long.	<0,0001
	Geral	121,72	125,03	133,41	121,28		Int. (TRxFL)	0,333
	Após desafio							
	30	146,28	140,92	156,28	140,37	145,96	Trat.	0,551
	37	148,68ab	136,31ab	121,02b	149,98a	139,00	Fat. Long.	0,179
	Geral	147,48	138,61	138,65	145,18		Int. (TRxFL)	0,019
	Após desafio							
Gordura (%)	30	9,20	8,66	9,10	10,12	9,27	Trat.	0,894
	37	8,53	9,08	9,30	8,07	8,74	Fat. Long.	0,134
	Geral	8,86	8,87	9,20	9,09		Int. (TRxFL)	0,062
	0	8,81	9,00	8,13	9,60	8,88	Trat.	0,200
	30	9,20	8,66	9,10	10,12	9,27	Fat. Long.	0,355
	Geral	9,01	8,83	8,61	9,86		Int. (TRxFL)	0,728
	Após desafio							
	30	9,20	8,66	9,10	10,12	9,27	Trat.	0,894
	37	8,53	9,08	9,30	8,07	8,74	Fat. Long.	0,134
	Geral	8,86	8,87	9,20	9,09		Int. (TRxFL)	0,062

¹FL: Fator Longitudinal em dias sendo 0 a coleta basal, 30 dias após a alimentação e 37 são 7 dias após o desafio subsequente aos 30 dias de alimentação.

²CMO: composição mineral óssea.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($\alpha=0,05$)

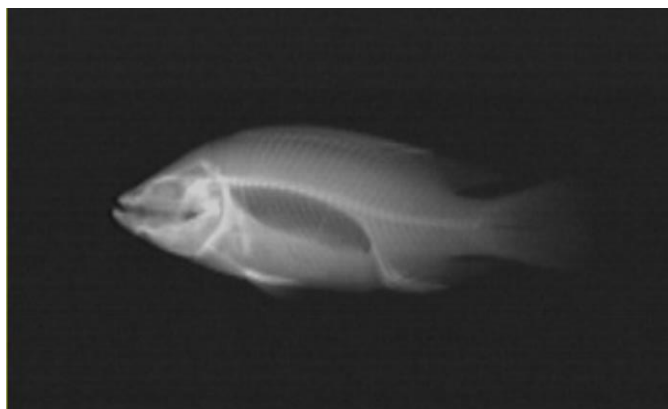


Figura 4 - Imagem do peixe escaneado em DXA

Sobrevivência após o desafio com a bactéria viva

Durante o desafio bacteriano, uma unidade experimental de cada tratamento foi inoculada com solução salina (PBS) e uma outra unidade experimental de cada tratamento não foi inoculada. Esses peixes foram alimentados com as dietas experimentais e observados pelo mesmo período dos peixes desafiados com a bactéria. Não houve mortalidade nessas unidades experimentais, denominadas controle, o que comprova que a mortalidade nas unidades experimentais desafiadas foi causada pela bactéria, sendo corroborado com sinais clínicos e reisolamento bacteriano dos peixes recém mortos após o desafio.

Nas unidades experimentais contendo os peixes desafiados, foi possível observar sinais característicos da estreptococose como letargia, isolamento do cardume, melanose, natação errática, hemorragia nas nadadeiras e exoftalmia (unilateral e bilateral) a partir do 4º dia. Após 20º do desafio houve estabilização da mortalidade.

A sobrevivência para os tratamentos foi de $65,29 \pm 5,15$ % para o tratamento controle (C), $64,11 \pm 10,18$ para a dieta contendo 37 mg kg^{-1} (N1), $67,27 \pm 8,56$ para a dieta contendo 75 mg kg^{-1} de nucleotídeo (N2) e $60,42 \pm 3,61$ % para a dieta contendo 150 mg kg^{-1} de nucleotídeo. Não houve mortalidade nos peixes inoculados com PBS, o que, juntamente com o reisolado bacteriano, comprova que a mortalidade presente nos tratamentos foi causada pelo inóculo. Não houve diferença significativa (Kaplan-Meier) na avaliação da sobrevivência dos peixes ao serem desafiados com *S. agalactiae* (Figura 5).

Análise de Sobrevivência

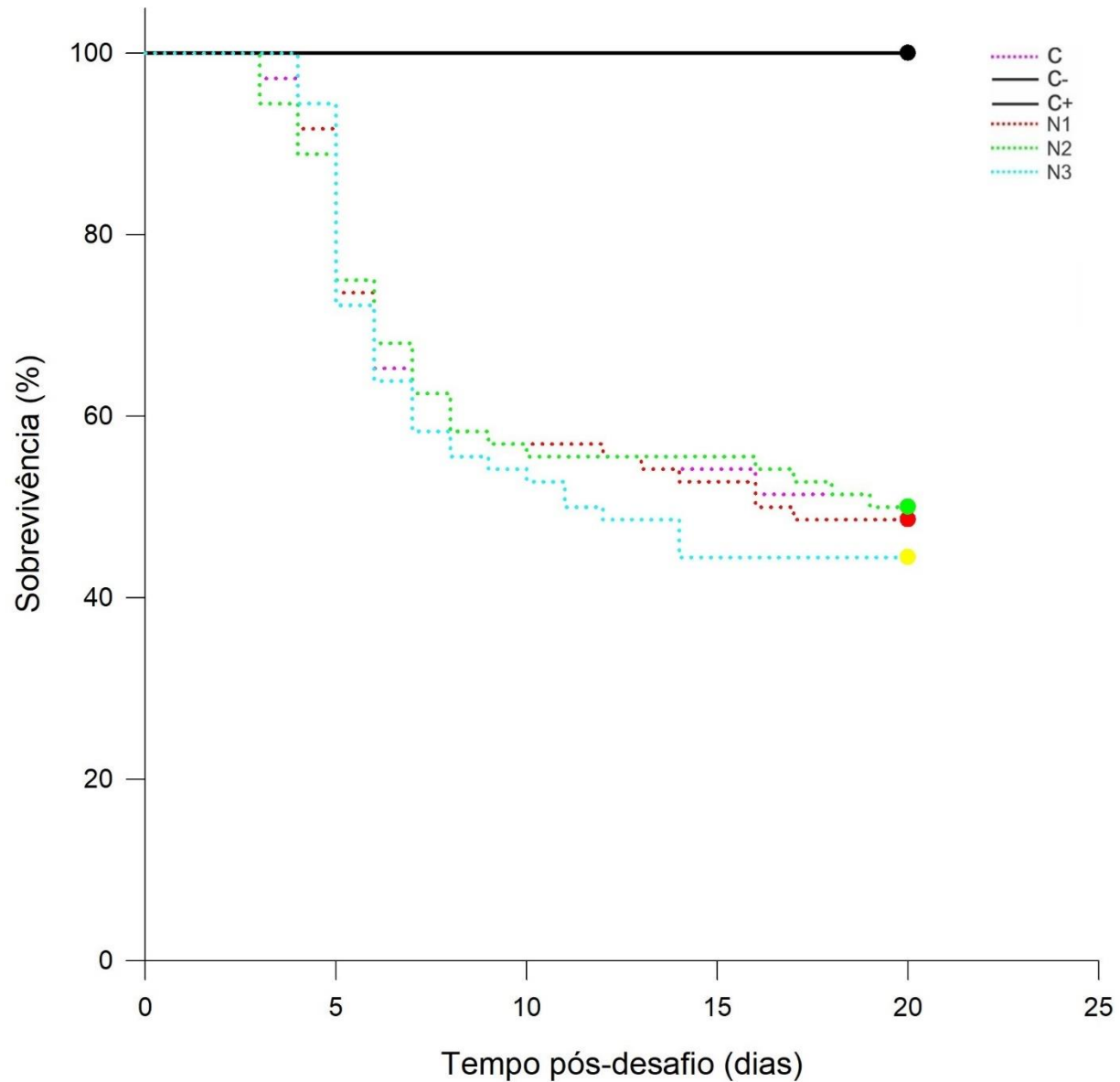


Figura 5 – Porcentagem de sobrevivência (%) da tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de nucleotídeos e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*. C: tratamento controle desafiados com a bactéria viva; C-: peixes que foram inoculados com PBS; C+: peixes que não sofreram desafio bacteriano; N1: peixes alimentados com 37 mg kg⁻¹ e desafiados com a bactéria viva; N2: peixes alimentados com 75 mg kg⁻¹ e desafiados com a bactéria viva; N3: peixes alimentados com 150 mg kg⁻¹ e desafiados com a bactéria viva.

Conclusão

Os resultados deste trabalho demonstram que com a dose de até 150 mg kg⁻¹ de nucleotídeos na dieta antes da extrusão, há indícios de ação imunomoduladora na tilápia-do-Nilo. Contudo, as doses utilizadas neste trabalho estão inferiores ao estipulado para o estudo. Novos estudos foram realizados ajustando-se a dosagem de inclusão do nucleotídeo na dieta para a tilápia.

Referências

- ABREU, J. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) Braz. J. Biol. 69 (4), 1133-1139. 2009. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000500018>.
- CARVER, J.D., WALKER, W.A. The role of nucleotides in human nutrition. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 6, 58-72. 1995. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(94\)00019-I](https://doi.org/10.1016/0955-2863(94)00019-I).
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. Bioquímica Ilustrada. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul (Artmed). 1996.
- COSGROVE, M. Nucleotides. *Nutrition* 14:748–751.1998
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401–1412. 1995.
- SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. *Ciência Rural*. v.33, n.5, p.983-990. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500029>
- KREUTZ, L. C.; PIETRETTI, D.; DOMENICO, J. di. Imunoestimulantes para uso na aquicultura. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; CUNHA, M. A. Farmacologia aplicada a aquicultura. Santa Maria, RS: Ed, UFSM. 2017.
- LI, P.; GATLIN III, D. M.; NEILL W. M. Dietary supplementation of a purified nucleotide mixture transiently enhanced growth and feed utilization of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Journal World Aquaculture Society* 38, 281–286. 2007.
- REDA, R. M.; SELIM, K. M.; MAHMOUD, R.; EL-ARABY, I. E. Effect of dietary yeast nucleotide on antioxidant activity, non-specific immunity, intestinal cytokines, and disease resistance in Nile Tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*. 80. 281-290. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.016>
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172(1–2):63–92. 1999. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00436-0](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00436-0).
- SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. *Ciência Rural*. v.33, n.5, p.983-990. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500029>
- SHIAU, S.; GABAUDAN, J.; LIN, Y. Dietary nucleotide supplementation enhances immune responses and survival to *Streptococcus iniae* in hybrid tilapia fed diet containing lowfish meal. *Aquaculture Reports*. 2. 77-81. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.08.002>

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA HEMATO-IMUNOLÓGICA INDUZIDA POR NUCLEOTÍDEO EM TILÁPIA-DO-NILO DESAFIADA COM *Streptococcus agalactiae*

Introdução

O consumo mundial de carne de pescado tem aumentado consideravelmente, com isso, tem-se alavancado a demanda pela produção (KONG et al., 2020). Estratégias como aumento da densidade de estocagem torna possível maior produção em menor espaço. Contudo, essa estratégia tem causado graves consequências, tanto ambiental quanto econômica. Os animais confinados em alta densidade se tornam suscetíveis às doenças, uma vez que essa situação provoca quebra do bem-estar e gera um grande estresse pela disputa por espaço e alimento (KREUTZ et al., 2017).

A fim de evitar perdas por mortalidades durante a produção, muitos produtores acabam utilizando antimicrobianos mesmo sem um correto diagnóstico do patógeno. Consequência disso é o surgimento de cepas resistentes a esses produtos, promovendo baixa eficiência no controle das doenças, além de risco à saúde humana devido a presença de resíduos na carne (NAKANISHI et al., 2002) quando as boas práticas veterinárias não são asseguradas. Estratégias nutricionais devem ser tomadas para conter a administração errônea desses produtos e evitar maiores impactos ambientais.

O uso de imunomoduladores já é conhecido na aquicultura por proporcionar bons resultados, como a melhora na resposta de defesa contra as adversidades em que os peixes são expostos, tornando-se uma ótima alternativa frente aos antimicrobianos e produtos químicos utilizados (BARROS et al., 2012). Imunomoduladores tais como probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, entre outros, têm apresentado inúmeros benefícios para os peixes, tais como aumentar o desempenho produtivo, melhora na resposta imune, sobrevivência e manutenção da saúde intestinal (KORD et al., 2021).

Dentre os imunomoduladores, um que vem se destacando no mercado aquícola é o nucleotídeo, composto intracelular de baixo peso molecular, que desempenha papel importante em quase todos os processos biológicos (GUO et al., 2019). Os nucleotídeos são considerados nutrientes não essenciais, pois o animal é capaz de sintetizar purinas e pirimidinas pela *via de novo* (LI et al., 2007). Contudo, quando em condições altamente desafiadoras, tais como estresse celular ou metabólico, a suplementação externa pode ser necessária (HESS & GREENBERG, 2012).

Pesquisas sobre a suplementação de nucleotídeos na dieta para as fases iniciais de peixes têm mostrado efeitos positivos no desempenho produtivo, assim como para a prole de reprodutores alimentados com nucleotídeos (LI & GATLIN III 2006). Seu uso atua benéficamente no metabolismo de lipídeos, funções hepáticas, estrutura intestinal, maturação gonadal, ativação e proliferação dos linfócitos, fagocitose de macrófagos, tolerância ao estresse e consequentemente maior resistência a infecções virais, bacterianas e parasitárias (SHIAU et al., 2015; REDA et al., 2018; LIMA et al., 2020).

A imunonutrição pode ser uma importante ferramenta na prevenção de doenças, como observado no robalo híbrido desafiado contra *Streptococcus agalactiae*. SHIAU et al. (2015) sugerem que a suplementação de 120 a 240 mg kg⁻¹ de nucleotídeos na dieta aumenta a resposta imune e a sobrevivência da tilápia híbrida (*O. niloticus* × *O. aureus*) desafiada contra *Streptococcus iniae*. LIMA et al. (2020) sugerem que a suplementação de 5,0 a 7,5 g kg⁻¹ de nucleotídeos purificados na dieta de reprodutores e matrizes de tilápia-do-Nilo, promoveu melhora na saúde e, nas taxas reprodutivas e no crescimento desta espécie. Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imunológica da tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo RNA como fonte de nucleotídeos dietéticos, o método de inclusão do nucleotídeo na dieta, avaliar a resposta imune e resistência contra *Streptococcus agalactiae*.

Materiais e métodos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal, em parceria com o Laboratório de Anatomia Animal da FCAV-Unesp de Jaboticabal.

O protocolo utilizado neste experimento está de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP protocolo nº 004605/19.

Delineamento experimental

Para execução do experimento, foram utilizados 630 juvenis de tilápia-do-Nilo, provenientes de piscicultura comercial, com peso médio de $61,45 \pm 0,71$ g e comprimento total médio de $15,3 \pm 0,09$ cm. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 21 unidades experimentais de 450 L, com aeração constante e sistema de entrada contínua de água independente em cada unidade experimental. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente e o delineamento experimental foi em esquema fatorial 2x4 com três níveis de suplementação de nucleotídeo e uma dieta controle (sem adição do produto) e, duas metodologias de incorporação do produto. Para cada tratamento foram utilizadas três réplicas.

Após 10 dias de aclimação, iniciou-se a alimentação com as dietas experimentais, fornecidas duas vezes ao dia (9h30 e 16h00) até a saciedade aparente, por um período de 90 dias. Uma amostra inicial de três peixes de cada tratamento foi utilizada para as análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas. Os peixes amostrados para as análises foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico em solução alcoólica de benzocaína (100 mg L^{-1}).

Durante todo o período experimental, as variáveis limnológicas da água foram monitoradas. A temperatura ($26,43 \pm 1,34^\circ\text{C}$) foi monitorada diariamente pela manhã e à tarde com auxílio de termômetro digital. O pH ($7,69 \pm 0,12$), oxigênio dissolvido ($5,25 \pm 0,98 \text{ mg L}^{-1}$) e a condutividade elétrica ($169,73 \pm 2,13 \mu\text{S cm}^{-1}$) foram monitoradas semanalmente com sonda multiparâmetros (AKSO modelo AK88).

Dieta experimental

Foi formulada uma dieta isoproteica e isenergética com suplementação vitamínica e mineral completa (Tabela 1). Com base na revisão bibliográfica, os níveis de nucleotídeo utilizados foram de 250, 500 e 1.000 mg kg^{-1} de RNA extraído da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, como fonte de nucleotídeos (Biotide Extra®, Biorigin, Brasil, contém 15% de nucleotídeos) com dois métodos de incorporação na ração: antes da extrusão e após a extrusão e uma dieta sem adição do nucleotídeo, denominada de controle.

A ração foi processada no Instituto de Pesca em São José do Rio Preto – SP. Os ingredientes selecionados (Tabela 1) foram moídos a 0,6 mm e extrusados, em extrusora Ferraz modelo E62, a secagem realizada em secador tubular rotativo contínuo. As rações denominadas N1 (250 mg kg^{-1}

¹), N2 (500 mg kg⁻¹) e N3 (1.000 mg kg⁻¹) receberam o composto com RNA – fonte de nucleotídeos – anterior a extrusão. O restante foi processado sem adição do produto e denominada Controle. Parte da ração controle foi conduzida para a fábrica de ração da Unesp para adição do nucleotídeo via *coating*, denominada N1 (250 mg kg⁻¹), N5 (500 mg kg⁻¹) e N6 (1.000 mg kg⁻¹). A fonte de nucleotídeo foi adicionada na ração e misturada por 15 min em um misturador tipo Y, posteriormente, adicionou-se 2% de CMC diluído em água (3:1000) e homogeneizado por mais 15 min. As rações foram secas em temperatura ambiente, embaladas e armazenadas em sala refrigerada.

As rações foram analisadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA/CAUNESP/FCAV). A proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl, o teor de extrato etéreo pelo método de hidrólise ácida e o material mineral determinado pela queima em forno mufla a 550°C, todos de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2005).

Tabela 11 – Ingredientes utilizados na composição da dieta experimental e composição química analisada

Composição da dieta (%)							
Milho grão	31,16						
Farelo de soja	25,00						
Farelo de trigo	16,77						
Quirera de arroz	5,00						
Farinha de vísceras	9,40						
Farinha de penas	7,90						
Farinha de carne e ossos	2,50						
Óleo de soja	1,00						
Premix*	0,30						
L-lisina	0,95						
Antioxidante	0,02						
Total	100,00						
Valores fornecidos calculados							
Proteína digestível	27,36						
Energia digestível	3059,99						
Fibra bruta	5,23						
Cálcio	0,81						
Fósforo	0,44						
Composição química analisada							
	C	N1	N2	N3	N4	N5	N6
Proteína Bruta	30,20	30,28	29,94	30,66	30,41	29,54	30,41
Extrato etéreo	5,27	5,38	5,02	5,45	5,46	5,59	5,44
Matéria mineral	8,03	8,00	8,12	7,64	7,90	8,15	7,65

C: controle sem nucleotídeo; N1: 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo anterior a extrusão; N2: 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo anterior a extrusão; N3: 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo anterior a extrusão; N4: 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo posterior a extrusão; N5: 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo posterior a extrusão; N6: 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo posterior a extrusão.

Composição da dieta baseado nos valores propostos por FURUYA (2010).

*Níveis de garantia (mínimo): Vitamina A = 1.000.000 UI.kg⁻¹; Vitamina D3 = 500.000 UI.kg⁻¹; Vitamina E = 20.000 UI.kg⁻¹; Vitamina K3 = 500 mg.kg⁻¹; Vitamina B1 = 1.900 mg.kg⁻¹; Vitamina B2 = 2.000 mg.kg⁻¹; Vitamina B6 = 2.400 mg.kg⁻¹; Vitamina B12 = 3.500 mg.kg⁻¹; Vitamina C = 25 g.kg⁻¹; Niacina = 5.000 mg.kg⁻¹; Ácido Pantotênico = 4.800 mg.kg⁻¹; Ácido fólico = 200 mg.kg⁻¹; Biotina = 40 mg.kg⁻¹; Manganês = 7.500 mg.kg⁻¹; Zinco = 25,0 g.kg⁻¹; Ferro = 12,50 g.kg⁻¹; Cobre = 2.000 mg.kg⁻¹; Iodo = 200 mg.kg⁻¹; Selênio = 70 mg.kg⁻¹; BHT = 300 mg.kg⁻¹.

Desempenho produtivo

Foram realizadas biometrias a cada 30 dias durante o período de experimentação. Os valores obtidos nas biometrias foram tabulados para obter os dados de desempenho produtivo:

Ganho em Peso (g): $GP = \text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}$;

Ganho em Peso Diário (g): $GPD = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{\text{Período Experimental (dias)}}$;

Conversão Alimentar Aparente: $CAA = \frac{\text{alimento fornecido (g)}}{\text{ganho em peso (g)}}$;

Taxa de Crescimento Específico (%): $TCE = 100x \frac{\ln \text{Peso Final} - \ln \text{Peso Inicial}}{\text{Período Experimental (dias)}}$;

Taxa de Eficiência Proteica (%): $TEP = 100x \frac{\text{Ganho em Peso}}{\text{Proteína Bruta Consumida}}$;

Ao final do período experimental foram realizadas as avaliações:

Índice Hepatossomático (%): $IHS = 100x \frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso corporal final}}$;

Índice de Gordura Viscerosomático (%): $IGVS = 100x \frac{\text{Peso de gordura víscerosomática}}{\text{Peso corporal final}}$;

Rendimento da Carcaça (%): $CAR = 100x \frac{\text{Peso da carcaça}}{\text{Peso corporal final}}$;

Rendimento de Filé (%): $FILÉ = 100x \frac{\text{Peso do filé}}{\text{Peso corporal final}}$.

Amostragem para colheita de sangue

Foram realizadas amostragens nos dias 0, 30, 60 e 90 dias após o início do fornecimento das dietas experimentais e, 3, 6 e 24 horas após o desafio bacteriano com a bactéria inativada. Em cada tempo de amostragem, nove peixes de cada tratamento, por coleta, foram anestesiados (solução alcoólica de benzocaína, 50 mg L⁻¹) e submetidos, à colheita de sangue por punção do vaso caudal com seringa sem anticoagulante.

Análises hematológicas

O sangue foi colhido por punção do vaso caudal e, uma alíquota (0,3 ml) heparinizada foi destinada à realização do hemograma e da atividade respiratória de leucócitos. Para a determinação dos parâmetros eritrocitários, a contagem do número de eritrócitos foi realizada em câmara Neubauer, utilizando-se solução formol-citrato segundo Ranzani-Paiva et al. (2013).

O hematócrito foi realizado seguindo a metodologia do microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). A determinação da quantidade de hemoglobina presente no sangue foi determinada através do método da cianometahemoglobina, adicionando-se 10 µL de sangue em 2,5 mL de reagente para hemoglobina e leitura realizada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 540 nm (COLLIER, 1944). As extensões sanguíneas foram coradas com MG-G-W (May-Grünwald-Gyemsa-Writh) para posterior contagem total e diferencial de trombócitos e leucócitos (TAVARES-DIAS & MORAES, 2006). As equações hematimétricas foram calculadas de acordo com Wintrobe (1934) para a determinação do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Uma alíquota de 2 ml de sangue foi acondicionada em microtubo de polipropileno, homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 120 min para coagulação e separação do soro. Os microtubos foram centrifugados em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5804 R refrigerada a 4°C durante 10 minutos a 1500G, separando-se o soro e armazenando a -80°C em ultrafreezer da marca Coldlab modelo CL200-86V, para posterior análises.

Atividade respiratória leucócitos

A produção de espécies reativas de oxigênio foi medida utilizando NBT (cloreto de nitrotetrazóliol, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil; # N6876), seguindo a metodologia descrita por Biller-Takahashi (2013). Imediatamente após a colheita do sangue, 50 µL de sangue heparinizado foram incubados com um volume igual de tampão NBT (0,2%) à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, 50 µL dessa amostra foi adicionada em 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil; # 227056), agitada e centrifugada para posterior leitura do sobrenadante em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, à temperatura ambiente.

Análises bioquímicas

Foram avaliadas a glicose, proteínas totais e albumina. A concentração de glicose foi mensurada pelo método de Trinder, proteínas totais pelo método de biureto e albumina pelo método de bromocresol, utilizando-se kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro marca Unico Spectrophotometer 2100 em comprimento de onda 540 nm.

Os níveis de cortisol foram aferidos por espectrofotometria utilizando o kit “DRG® Cortisol ELISA” (EIA-1887; DRG International, Inc USA, <http://www.drginternational.com>).

Atividade enzimática (AST e ALT)

A atividade sérica das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram aferidas por kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil) utilizando-se metodologia cinética UV-IFCC com comprimento de onda de 340nm utilizando espectrofotômetro da marca Thermo Scientific Genesys modelo 10S UV-VIS.

Atividade lisozima

A concentração da lisozima foi determinada segundo metodologia proposta por Ellis (1990), modificada por Abreu (2009) e Biller-Takahashi et al., (2013). Para tanto, 50 µL de soro foi adicionado a 75 µL de tampão fosfato monobásico (lysozyme - Sigma-Aldrich, Germany), posteriormente, 100 µL de solução contendo *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg mL⁻¹) foi

misturada e lida imediatamente em leitor de microplacas ELISA (ThermoPlate Reader MN) e medida pela redução da absorbância da solução à 450 nm a cada cinco minutos, durante dez minutos.

Atividade Complemento

A atividade do sistema complemento (via alternativa) foi determinada segundo a metodologia descrita por Zanuzzo et al., (2015). Para tanto, 25 µl de cada amostra de soro mais 75 µl de tampão TEA-EGTA-Mg²⁺ (ácido trietanolamina etilenoglicol tetracético, 8 mM, 2 mM de Mg²⁺ e 0,1 % de gelatina) foram adicionados à 200 µl de solução contendo hemácias de coelho (2 x 10⁸ células por mL). A análise foi realizada em leitor de microplacas ELISA (EPOCH 2, BioTek) para avaliação do tempo requerido em segundos para a densidade óptica ser reduzida pela metade (50 % de hemólise de hemácias de coelho pela via alternativa do complemento). A atividade foi transformada pela seguinte fórmula: ACH50 = 1 / *leitura da amostra* de acordo com Zanuzzo et al., (2017).

Composição corporal

Ao final do período de alimentação (90 dias), dois peixes de cada unidade experimental (seis por tratamento) foram submetidos à análise de composição corporal e densitometria óssea no aparelho de absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal (Figura 4).

Antes do escaneamento, o DXA (Hologic® (Hologic Delphi QDR, Hologic Discovery QDR, Bedford, MA, USA) foi calibrado com um phantom (modelo similar às vértebras, fornecido pelo fabricante). Os animais foram pesados e mensurados quanto ao comprimento com fita métrica comum milimetrada e, em seguida, anestesiados com benzocaína (50 mg L⁻¹).

Posterior à perda dos reflexos, cada peixe foi posicionado em decúbito lateral na plataforma do densitômetro Hologic, Discovery Si. para realização de uma varredura no modo corpo total com área definida de acordo com o tamanho do animal. Após leitura de dados em software *small*

animal do equipamento, foi obtida a porcentagem de gordura (%) quantidade de gordura (g), densidade mineral óssea (g/cm²), conteúdo mineral ósseo (g) e porcentagem de massa magra (%).

Para avaliação do filé, dois peixes de cada unidade experimental (seis por tratamento), após avaliação dos índices somáticos citados no tópico de desempenho produtivo, os filés foram separados e congelados para posterior análise. Para avaliação da composição química, os filés foram pré-secos em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas e, analisados no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA/CAUNESP/FCAV). A umidade foi aferida através de secagem em estufa a 105°C por oito horas, a proteína bruta, determinada pelo método de Kjeldahl, o teor de extrato etéreo utilizando extrator Soxhlet utilizando éter como solvente e o material mineral determinado pela queima em forno mufla a 550°C, todos de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2005).

Desafio bacteriano com *Streptococcus agalactiae* não tipável vivo

Um dia após a última coleta (dia 90), 10 peixes de cada tratamento com três repetições foram avaliados quanto à sua resistência contra *Streptococcus agalactiae* após infecção experimental, na dose de $5,5 \times 10^7$ UFC, estabelecida previamente em ensaio de DL50%. Os peixes foram infectados com injeção contendo a bactéria na região intraperitoneal. A cepa bacteriana utilizada, proveniente da própria coleção do LAPOA, isolada de tilápia-do-Nilo (cepa d115c), identificada por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (número de acesso do GenBank KU605571) foi cultivada em meio TSB (Triplic Soy Broth, Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubada a 28°C por 24 horas em estufa incubadora. Após o período de incubação, o meio foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a $3.000 \times g$ em centrífuga refrigerada modelo Eppendorf 5804 R. As células bacterianas foram lavadas duas vezes com tampão PBS (0,01 M) sob as mesmas condições e suspenso no mesmo tampão. Foram avaliados o comportamento e os sinais clínicos, além de mortalidade diária durante 15 dias após a infecção. Peixes recém-mortos de cada tratamento foram utilizados para reisolamento da bactéria utilizando o rim e cérebro para confirmação da infecção pela bactéria.

Desafio com a bactéria inativa

A mesma bactéria utilizada no desafio anterior foi novamente utilizada, todavia, inativada para estimular o sistema imunológico das tilápias e evitar mortalidade. A bactéria foi inativada em banho-maria à 56° (Inbras ALB 250S) por 30 min e inoculada na cavidade celomática de 30 peixes por grupo na dose previamente determinada pela DL50.

As 3, 6 e 24 horas após o desafio, o sangue foi colhido por punção do vaso caudal, de nove peixes por grupo para realização das análises hematológicas e imunológicas como descrito anteriormente.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de modelo fatorial 2x4. Quando observado significância para os fatores, as médias foram diferenciadas com o teste Student-T, e quando houve interação dos fatores, as médias dos tratamentos foram analisadas com Tukey-HSD. Quando apresentou interação entre os fatores e os fatores de forma independente, apenas a interação foi considerada. Os dados foram analisados com o software JMP 14.0 (SAS Institute, CA, USA).

Resultados

Desempenho produtivo

Os resultados do ganho em peso, ganho em peso diário, fator de condição, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) após 30, 60 e 90 dias de alimentação com as dietas experimentais (Tabela 12). Ao final dos 90 dias, a porcentagem de carcaça e porcentagem de filé não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 13).

O índice hepatossomático (IHS) e índice de gordura viscerossomático (IGVS) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando avaliado o fator tratamento (Tabela 13). Quando avaliado o fator níveis de inclusão do nucleotídeo (Figura 6), os peixes que não receberam o aditivo apresentaram maior valor (2,93) para o IHS e os alimentados com dieta contendo 1.000

mg kg⁻¹ de nucleotídeo o menor valor (2,47). O IGVS foi maior nos peixes do grupo controle e nos peixes alimentados com a dieta contendo 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo (2,95 e 2,59 respectivamente). O menor valor significativo (p=0,02) observado para o IGVS foi nos peixes alimentados com dieta contendo 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo (2,32).

Tabela 12 – Desempenho produtivo de tilápia-do-Nilo alimentados por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo. Porcentagem do ganho em peso (GP), fator de condição (FF), ganho em peso diário em gramas (GPD), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência proteica (TEF).

Níveis	30 dias						60 dias						90 dias					
	GP	FF	GPD	CAA	TCE	TEF	GP	FF	GPD	CAA	TCE	TEF	GP	FF	GPD	CAA	TCE	TEF
Controle	103	1,83	2,1	1,16	2,35	2,68	287,1	1,91	3,29	1,36	1,8	2,31	467,2	1,9	2,69	1,98	0,88	1,58
250 AE	125,2	1,8	2,55	1,13	2,66	2,76	307,1	1,92	3,16	1,49	1,57	2,09	501,2	1,91	2,95	2,05	0,9	1,55
500 AE	111,8	1,83	2,25	1,2	2,46	2,61	292,9	1,89	3,21	1,4	1,7	2,23	488,2	1,9	2,83	1,94	0,89	1,61
1000 AE	110,8	1,8	2,23	1,21	2,44	2,58	297,4	1,88	3,31	1,44	1,75	2,16	466,6	1,88	2,15	2,56	0,7	1,27
250 PE	114,2	1,83	2,29	1,11	2,53	2,81	305,9	1,91	3,38	1,43	1,73	2,19	512,2	1,91	3,03	1,93	0,91	1,65
500 PE	110	1,76	2,26	1,14	2,47	2,74	299,7	1,91	3,3	1,37	1,73	2,27	501,7	1,93	3,06	1,84	0,96	1,71
1000 PE	104,8	1,8	2,15	1,15	2,38	2,72	279,7	1,87	3,12	1,38	1,7	2,26	464,7	1,9	2,55	2,12	0,82	1,48
PSE	7,5	0,02	0,14	0,03	0,11	0,07	13,6	0,02	0,17	0,05	0,07	0,08	16,2	0,02	0,24	0,19	0,08	0,11
<i>Fator: Extrusão</i>																		
Antes	112,7	1,81	2,28	1,17	2,48	2,66	296,1	1,9	3,24	1,42	1,71	2,2	480,8	1,9	2,65	2,13	0,84	1,5
Após	108	1,8	2,2	1,14	2,43	2,74	293,1	1,9	3,27	1,38	1,74	2,26	486,5	1,91	2,83	1,97	0,89	1,6
<i>Fator: Níveis</i>																		
0	103	1,83	2,1	1,16	2,35	2,68	287,1	1,91	3,29	1,36	1,8	2,31	467,2	1,9	2,69	1,98	0,88	1,58
250	119,7	1,81	2,42	1,12	2,6	2,78	306,5	1,92	3,27	1,46	1,65	2,14	506,7	1,91	2,99	1,99	0,91	1,6
500	110,9	1,8	2,25	1,17	2,46	2,67	296,3	1,9	3,25	1,38	1,71	2,25	494,9	1,92	2,94	1,89	0,92	1,66
1000	107,8	1,8	2,19	1,18	2,41	2,65	288,5	1,87	3,22	1,41	1,73	2,21	465,7	1,89	2,35	2,34	0,76	1,48
<i>P-value</i>																		
Extrusão	0,38	0,66	0,42	0,16	0,58	0,14	0,75	0,87	0,8	0,32	0,52	0,34	0,62	0,61	0,31	0,23	0,4	0,23
Níveis	0,19	0,54	0,2	0,34	0,22	0,34	0,48	0,37	0,97	0,29	0,32	0,3	0,053	0,75	0,06	0,13	0,21	0,11
Extrusão x Níveis	0,88	0,32	0,78	0,7	0,93	0,74	0,83	0,9	0,67	0,91	0,56	0,93	0,95	0,95	0,84	0,69	0,87	0,84

PSE: erro padrão agrupado; AE antes da extrusão; PE: após extrusão

Tabela 13 - Índice hepatossomático, gordura viscerossomático, rendimento de carcaça e filé de tilápia-do-Nilo alimentados por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo.

Níveis	IHS %	IGVS %	CAR %	Filé %
Controle	2,92	2,95	51,9	27,7
250 AE	2,68	2,27	52,7	28
500 AE	2,47	2,43	53,3	27,4
1000 AE	2,43	2,85	53,3	27,3
250 PE	2,45	2,54	52,2	27,8
500 PE	2,59	2,22	53,3	27,2
1000 PE	2,52	2,33	52,8	28
PSE	0,14	0,19	0,57	0,58
<i>Fator: Extrusão</i>				
Antes	2,63	2,63	52,8	27,6
Após	2,62	2,51	52,5	27,7
P-value				
Extrusão	0,96	0,42	0,52	0,81
Extrusão x Níveis	0,63	0,26	0,93	0,82

PSE: Erro padrão agrupado; AE: antes da extrusão; PE: após a extrusão

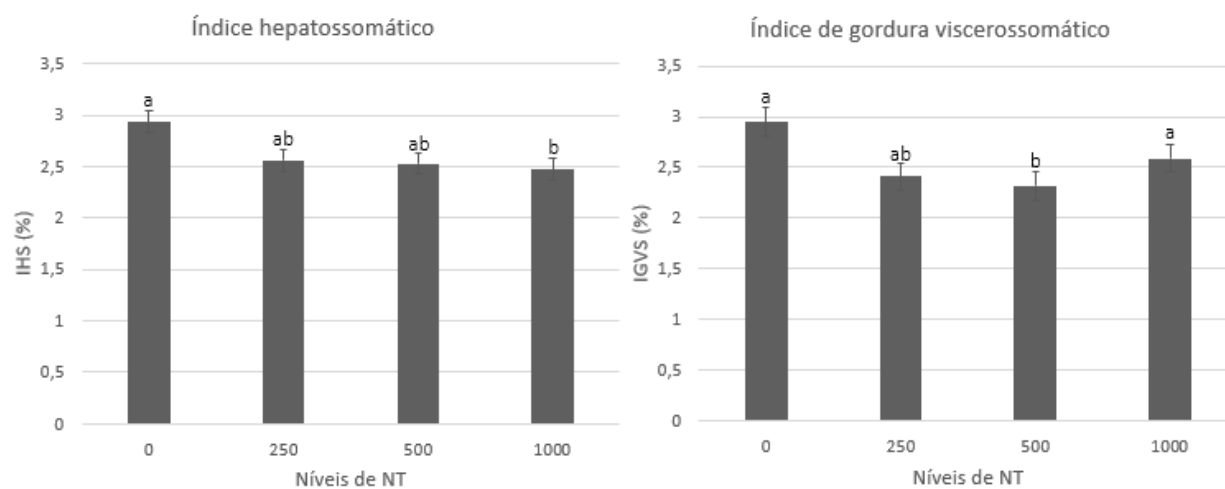


Figura 6 – Índice hepatossomático (IHS) ($P = 0,02$) e Índice de gordura viscerossomática (IGVS) ($P = 0,02$) de tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeos.

Análises hematológicas

As variáveis hematológicas avaliadas não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) durante o período de desempenho produtivo avaliado níveis de inclusão de nucleotídeos (Tabela 14).

Após o desafio com a bactéria inativada, os peixes alimentados com a dieta contendo 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo incorporado via *coating* apresentaram a menor quantidade de eritrócitos (RBC) ($1,30 \times 10^4$) e os peixes alimentados com dieta contendo 250 e 500 mg kg⁻¹ ($1,71 \times 10^4$ e $1,68 \times 10^4$ respectivamente) as maiores quantidade de eritrócitos (Tabela 5).

Os valores do volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre os níveis de inclusão do nucleotídeo seis horas após o desafio (Tabela 5). O menor valor foi observado no peixes que receberam a dieta controle (167,9 fL e 41,2 pg respectivamente), enquanto que o maior valor foi observado nos peixes alimentados com dieta contendo 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo (207,1 fL e 47,8 pg).

As 24 horas após o desafio bacteriano, os peixes que receberam a dieta contendo 250 mg kg⁻¹ antes da extrusão e 1.000 mg kg⁻¹ após a extrusão apresentaram valor superior na contagem de células vermelhas (RBC) sendo $1,63 \times 10^4$ e $1,37 \times 10^4$, respectivamente. Contudo, não diferiram da dieta controle ($1,44 \times 10^4$). Já o menor valor foi observado nos peixes alimentados com a dieta contendo 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo após a extrusão ($1,37 \times 10^4$) (Tabela 5). A porcentagem de hemoglobina (HG) e a concentração de hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos de administração do produto, contudo, com relação aos níveis, observou-se maior valor (7,61) nos peixes alimentados com dietas suplementadas com 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo e maior valor (26,3 g.dL⁻¹) para CHCM nos peixes alimentados com a dieta controle.

Tabela 14 – Parâmetros hematológicos de tilápia-do-Nilo após 90 dias de alimentação com dietas suplementadas com nucleotídeo.

Níveis	30 dias						60 dias						90 dias					
	RBC	HT	HG	VCM	HCM	CHCM	RBC	HT	HG	VCM	HCM	CHCM	RBC	HT	HG	VCM	HCM	CHCM
Controle	1,72	28,6	7,95	172,4	46,7	27,6	1,71	30,4	8,08	175,8	48,2	26,6	1,67	32	7,97	196,6	48,9	24,9
250 AE	1,57	26,3	6,64	165,4	42,7	29	1,82	30,8	8,28	186,1	46,5	26,8	1,65	31	7,79	192	47,7	25,2
500 AE	1,43	27	7,28	178,5	49,8	29,5	1,6	27,3	7,12	167,8	25	28	1,75	32	7,72	185	44,6	24,3
1000 AE	1,69	25,3	7,59	144,8	45,4	32,9	1,65	28,2	7,75	172,6	47,4	27,9	1,54	32	7,68	210,6	50,6	24
250 PE	1,6	22,4	6,36	143,6	40,3	27,6	1,76	32,6	8,17	182,1	46,4	26,3	1,51	31,3	7,68	207,4	52,5	25,3
500 PE	1,81	28,1	8,12	159,7	45	29,3	1,75	30,4	8,42	182,8	48,6	27,3	1,71	29,3	7,44	173	43,9	25,4
1000 PE	1,7	28,5	7,49	156,2	43,1	30,4	1,74	32,7	8,42	189	48,6	25,7	1,63	30,1	7,25	185,3	44,6	24,3
PSE	0,09	2,23	0,51	15,2	2,9	2,1	0,11	2,07	0,38	20,8	3,1	1,6	0,09	1,43	0,29	13,6	2,5	0,7
<i>Fator: Extrusão</i>																		
Antes	1,6	26,8	7,36	165,3	46,2	29,7	1,7	29,2	7,81	175,6	46,8	27,3	1,65	31,7	7,97	196,4	47,9	24,6
Após	1,71	26,9	7,48	158	43,8	28,7	1,74	31,5	8,27	182,4	48	26,5	1,63	30,7	7,59	189	47,4	25
<i>Fator: Níveis</i>																		
0	1,72	28,6	7,95	172,5	46,7	27,6	1,71	30,4	8,08	175,8	48,2	26,6	1,67	32	7,97	196,6	48,9	24,9
250	1,58	24,3	6,5	154,5	41,5	28,3	1,79	31,7	8,22	184,1	48,5	26	1,58	31,1	7,74	199,7	50,1	25,3
500	1,62	27,5	7,7	169,1	47,4	29,4	1,68	28,8	7,77	175,3	46,8	27,7	1,73	30,6	7,58	179	44,3	24,9
1000	1,69	26,9	7,54	150,5	44,3	31,6	1,7	30,5	8,09	180,9	48	26,8	1,59	31	7,47	197,9	47,6	24,2
P-value																		
Extrusão	0,13	0,95	0,75	0,53	0,27	0,53	0,59	0,15	0,1	0,66	0,59	0,48	0,74	0,34	0,33	0,59	0,78	0,53
Níveis	0,5	0,41	0,059	0,44	0,22	0,3	0,77	0,66	0,7	0,97	0,92	0,89	0,39	0,82	0,38	0,45	0,16	0,6
Extrusão x Níveis	0,19	0,56	0,71	0,7	0,88	0,92	0,8	0,73	0,26	0,95	0,92	0,92	0,7	0,71	0,84	0,58	0,25	0,89

PSE: erro padrão agrupado; AE: antes da extrusão; PE: após extrusão; RBC: contagem de glóbulos vermelhos ($10^6/\text{mm}^3$); HT: Hematócrito (%); HG: hemoglobina (g dL^{-1}); VCM: Volume Corpuscular Médio (fL); Hemoglobina Corpuscular Média (pg); Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%)

Tabela 15 - Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo após 90 dias de alimentação com dietas suplementadas com nucleotídeo e inoculadas com cepa inativada de *Streptococcus agalactiae*

Níveis	3 horas						6 horas						24 horas					
	RBC	HT	HG	VCM	HCM	CHCM	RBC	HT	HG	VCM	HCM	CHCM	RBC	HT	HG	VCM	HCM	CHCM
Controle	1,62 ^{AB}	24,7	5,87	156,7	38,1	23,9	1,6	26,7	6,69	167,9	41,2	25,3	1,44 ^{ABC}	28,3	7,16	196,3	49,7	26,3
250 AE	1,59 ^{AB}	24,5	6,01	155,1	42,1	24,54	1,46	30,2	6,61	210,2	44,9	21,6	1,63 ^A	32,5	7,19	198,4	44	22
500 AE	1,51 ^{AB}	25,5	6,37	166,4	34,6	25,85	1,45	29,8	6,73	210,8	47,5	22,6	1,46 ^{ABC}	28	6,98	185,4	46,2	25
1000 AE	1,58 ^{AB}	24,8	5,5	156,3	36,2	24,63	1,39	29,3	6,69	207,6	47,9	23,6	1,59 ^{AB}	31,8	7,85	210,8	52	24,6
250 PE	1,71 ^A	26,0	6,35	153,7	37,09	24,58	1,53	28,1	6,34	184	41,9	23,7	1,4 ^{BC}	32,7	6,98	237,5	50,3	21,6
500 PE	1,68 ^A	22,3	6,34	147,8	38,03	24,84	1,4	29	6,68	203,4	48,1	22,8	1,37 ^C	28,7	6,64	211,8	49	23,1
1000 PE	1,38 ^B	22,7	5,62	167,8	40,87	26,04	1,42	26,4	6,05	194,9	45,5	22,6	1,62 ^A	31,2	7,37	197,1	46,7	24
PSE	0,06	2,6	0,35	10,93	1,93	2,16	0,05	1,43	0,2	13,05	2,52	1,24	0,04	1,33	0,22	12,5	2,3	1,2
Fator: Extrusão																		
Antes	1,57	24,8	5,94	158,6	37,76	24,5	1,48	29	6,7	199,1	45,4	23,3	1,53	30,1	7,29	197,7	47,9	24,5
Após	1,6	23,9	6,05	155,2	38,04	24,6	1,49	27,6	6,44	187,6	44,2	23,6	1,46	30,3	7,04	210,7	48,9	23,7
Fator: Níveis																		
0	1,62	24,7	5,87	156,7	36,18	23,9	1,6 ^A	26,7	6,69	167,9 ^B	41,2 ^B	25,3	1,44	28,3	7,16 ^{AB}	196,3	49,7	26,3 ^A
250	1,65	25,2	6,18	154,4	37,6	24,7	1,49 ^{AB}	29,1	6,47	197,1 ^{AB}	43,4 ^{AB}	22,6	1,52	32,6	7,08 ^B	217,9	47,1	21,8 ^B
500	1,59	23,9	6,36	157,1	40,09	25,3	1,42 ^B	29,4	6,71	207,1 ^A	47,8 ^A	22,7	1,42	28,4	6,81 ^{AB}	198,6	47,6	24,1 ^{AB}
1000	1,48	23,8	5,56	159,5	37,74	24,2	1,4 ^B	27,8	6,42	201,3 ^{AB}	46,7 ^{AB}	23,1	1,6	31,5	7,61 ^A	204	49,4	24,3 ^{AB}
P-value																		
Extrusão	0,35	0,54	0,66	0,59	0,84	0,93	0,77	0,16	0,1	0,21	0,49	0,72	0,03	0,9	0,1	0,11	0,54	0,33
Níveis	0,04	0,86	0,13	0,94	0,25	0,85	0,0001	0,24	0,46	0,02	0,03	0,14	0,001	0,002	0,006	0,26	0,59	0,005
Extrusão x Níveis	0,02	0,63	0,95	0,48	0,06	0,91	0,7	0,77	0,38	0,78	0,86	0,67	0,04	0,95	0,73	0,09	0,07	0,86

PSE: erro padrão agrupado; AE: antes da extrusão; PE: após extrusão; RBC: contagem de glóbulos vermelhos ($10^6/\text{mm}^3$); HT: Hematócrito (%); HG: hemoglobina (g dL^{-1}); VCM: Volume Corpuscular Médio (fL); Hemoglobina Corpuscular Média (pg); Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%)

Atividade respiratória de leucócitos (Burst)

A atividade respiratória dos leucócitos não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos durante o período de alimentação. Entre os níveis de inclusão, em 30 dias de alimentação, observou-se maior atividade (0,464) nos peixes alimentados com a dieta suplementada com 1.000 mg kg^{-1} de nucleotídeo e, menor atividade nos peixes alimentados com a dieta contendo 250 mg kg^{-1} (Tabela 16). Em três horas após o desafio, o menor valor (0,319) de atividade respiratória dos leucócitos foi observado nos peixes alimentados com a dieta contendo 1.000 mg kg^{-1} de nucleotídeo após a extrusão. Seis horas após o desafio bacteriano, o burst respiratório não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos, contudo, ao observar o fator nível, os peixes alimentados com a dieta controle, foram os que apresentaram maior atividade (0,424).

Tabela 16 – Atividade respiratória de leucócitos de tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiadas com cepa inativada de *Streptococcus agalactiae*

Níveis	30 dias	60 dias	90 dias	3 horas	6 horas	24 horas
Controle	0,443	0,407	0,413	0,406 ^A	0,434	0,418
250 AE	0,412	0,433	0,417	0,398 ^A	0,397	0,403
500 AE	0,397	0,415	0,398	0,386 ^A	0,406	0,411
1000 AE	0,469	0,404	0,418	0,405 ^A	0,395	0,419
250 PE	0,432	0,422	0,397	0,411 ^A	0,409	0,391
500 PE	0,448	0,432	0,399	0,403 ^A	0,392	0,399
1000 PE	0,457	0,439	0,405	0,319 ^B	0,377	0,434
PSE	0,01	0,008	0,01	0,01	0,008	0,01
<i>Fator: Extrusão</i>						
Antes	0,43	0,415	0,411	0,399	0,408	0,413
Após	0,445	0,425	0,403	0,385	0,403	0,411
<i>Fator: Níveis</i>						
0	0,443 ^{AB}	0,407	0,413	0,406	0,424 ^A	0,418
250	0,422 ^B	0,428	0,407	0,405	0,402 ^B	0,397
500	0,422 ^{AB}	0,424	0,398	0,395	0,399 ^B	0,405
1000	0,463 ^A	0,422	0,411	0,362	0,386 ^B	0,426
P-value						
Extrusão	0,16	0,1	0,39	0,19	0,37	0,82
Níveis	0,03	0,12	0,69	0,01	0,0001	0,12
Extrusão x Níveis	0,18	0,07	0,82	0,002	0,28	0,7

PSE: erro padrão agrupado; AE antes da extrusão; PE: após extrusão

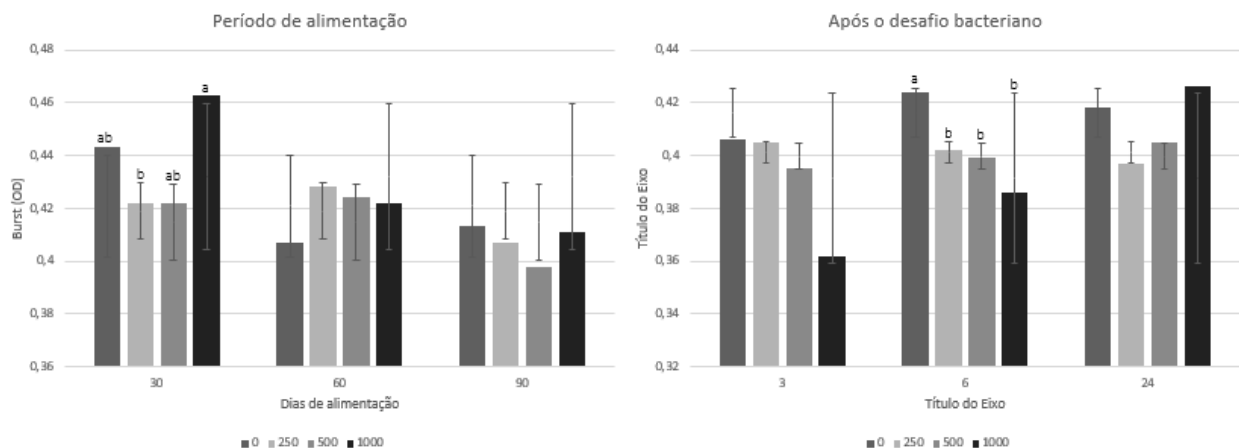


Figura 7 – Atividade respiratória de leucócitos da tilápia-do-Nilo durante o período de alimentação e após o desafio bacteriano.

Análises bioquímicas

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) nas variáveis bioquímicas para o fator tratamentos durante o período de desempenho produtivo (Tabela 17). Aos 60 dias de alimentação, a glicose não apresentou diferença significativa avaliando o fator tratamentos ($p<0,05$), mas para o fator nível, o menor valor foi observado nos peixes alimentados com as dietas suplementadas com 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo (28,3 mg L⁻¹) e maior valor (40,4 mg L⁻¹) nos peixes alimentados com as dietas suplementadas com 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo independentemente do método de incorporação.

Seis horas após o desafio bacteriano, a quantidade de proteínas totais foi maior (3,47 g dL⁻¹) nos peixes alimentados com dieta suplementada com 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo via *coating* e menor (3,18 g dL⁻¹) nos peixes alimentados com dieta suplementada com 1.000 mg kg⁻¹ via *coating*. A glicose não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$), contudo para o fator nível, ela foi menor (24,2 mg L⁻¹) nos peixes alimentados com a dieta controle e maior (43,5) nos peixes alimentados com as dietas suplementadas com 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo nos dois métodos de incorporação.

Não houve diferença significativa nos níveis de cortisol durante o período de alimentação, assim como após o desafio bacteriano. Também não foi observada interação entre os fatores.

Atividade enzimática

A alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos durante os 30, 60 e 90 dias de alimentação.

Quando desafiadas, após três horas, a ALT foi maior (55,6 UI L⁻¹) nos peixes alimentados com dieta suplementada com 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo após a extrusão e menor (32,9 UI L⁻¹) nos peixes alimentados com a dieta controle (Tabela 19).

Após seis e 24 horas, a atividade enzimática não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos.

Às 24 horas após o desafio, a AST ($p<0,05$) foi maior (32,6 UI L⁻¹) nos peixes alimentados com dieta suplementada com nucleotídeo antes da extrusão e o menor valor (26,6 UI L⁻¹) nos peixes alimentados com dieta contendo nucleotídeo incorporado após a extrusão (Tabela 19).

Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos da tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo.

Níveis	30 dias				60 dias				90 dias			
	PT	AL	GL	CT	PT	AL	GL	CT	PT	AL	GL	CT
Controle	2,92	0,8	36,8	128,2	3,02	0,7	37,6	250,4	3,00	0,75	32,7	107,7
250 AE	2,71	0,78	30,4	241,8	3,13	0,73	42,9	116,6	3,02	0,75	32,4	143,5
500 AE	2,86	0,76	32,9	104,9	3,13	0,73	28,3	44,5	3,08	0,77	34,7	136,1
1000 AE	2,92	0,76	39	226,7	3,13	0,76	36,9	197,1	3,24	0,82	35,9	169,9
250 PE	2,92	0,78	30,5	292,2	3,17	0,78	37,9	189,4	3,22	0,81	35,7	520,8
500 PE	2,98	0,76	35,3	169,7	3,14	0,72	28,2	293,9	2,97	0,75	25,7	65,7
1000 PE	2,85	0,78	39,3	1190,7	3,19	0,77	34,3	86,1	3,14	0,75	26,3	222,5
PSE	0,12	0,04	4,4	339,4	0,11	0,02	3,5	83,6	0,08	0,03	4,8	94,7
<i>Fator: Extrusão</i>												
Antes	2,85	0,77	34,8	472,1	3,1	0,73	36,5	205,6	3,09	0,77	33,9	229,2
Após	2,92	0,78	35,5	178,5	3,13	0,75	34,5	153,7	3,08	0,77	30,1	139,3
<i>Fator: Níveis</i>												
0	2,92	0,8	36,8	128,2	3,02	0,7	37,6 ^{AB}	250,5	3	0,75	32,7	107,7
250	2,82	0,78	30,4	266,9	3,15	0,75	40,4 ^A	152,9	3,12	0,78	34,1	332,1
500	2,92	0,76	34,1	137,3	3,14	0,72	28,3 ^B	169,2	3,02	0,76	30,2	100,9
1000	2,89	0,77	39,1	752,5	3,15	0,77	35,6 ^{AB}	141,6	3,19	0,79	31,1	196,2
P-value												
Extrusão	0,48	0,86	0,82	0,25	0,66	0,35	0,45	0,38	0,97	0,77	0,27	0,18
Níveis	0,84	0,69	0,26	0,26	0,63	0,054	0,02	0,56	0,12	0,69	0,86	0,07
Extrusão x Níveis	0,71	0,99	0,99	0,39	0,97	0,52	0,88	0,96	0,22	0,34	0,45	0,10

PSE: erro padrão agrupado; AE antes da extrusão; PE: após extrusão; PT: proteína totais (g dL⁻¹); AL: albumina (g dL⁻¹); GL: glicose (mg L⁻¹); CT: cortisol (ng ml⁻¹)

Tabela 18 – Parâmetros bioquímicos da tilápia-do-Nilo após 90 dias de alimentação com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* inativada.

Níveis	3 horas				6 horas				24 horas			
	PT	AL	GL	CT	PT	AL	GL	CT	PT	AL	GL	CT
Controle	3,53	0,58	56,35	772,6	3,42 ^{AB}	0,72	24,2	414,1	2,02	0,81	58,4	249,5
250 AE	3,35	0,63	53,13	378,9	3,18 ^B	0,76	51,4	289,4	2,06	0,84	66,5	61
500 AE	3,51	0,68	60,64	682,6	3,26 ^{AB}	0,73	33,5	269,6	2,12	0,86	59,6	119
1000 AE	3,25	0,65	40,1	182,8	3,3 ^{AB}	0,77	37,7	1557,9	2,06	0,91	61,3	122,7
250 PE	3,89	0,6	39,86	260,1	3,34 ^{AB}	0,7	28,4	172,4	2,08	0,89	71,4	487,7
500 PE	3,45	0,66	48,57	174,0	3,47 ^A	0,73	33,4	409,8	2,02	0,78	68	103,6
1000 PE	3,22	0,65	64,84	201,3	3,18 ^B	0,7	49,4	492,0	2,24	0,93	73,8	103,3
PSE	0,22	0,02	6,07	335,3	0,06	0,02	5,9	354,9	0,007	0,06	5,3	154,5
<i>Fator: Extrusão</i>												
Antes	3,41	0,63	52,56	359,7	3,29	0,75	36,7	368,6	2,07	0,85	61,5	241,8
Após	3,52	0,62	52,4	504,9	3,35	0,71	33,9	592,5	2,09	0,86	67,9	139,5
<i>Fator: Níveis</i>												
0	3,53	0,58 ^B	56,35	772,6	3,42	0,72	24,2 ^B	414,1	2,02	0,81	58,4	249,5
250	3,62	0,62 ^{AB}	46,49	319,5	3,26	0,73	39,9 ^{AB}	230,9	2,07	0,86	68,9	274,3
500	3,48	0,67 ^A	54,6	428,3	3,37	0,73	33,5 ^{AB}	345,1	2,07	0,83	63,8	112
1000	3,24	0,65 ^A	52,47	192,1	3,24	0,74	43,5 ^A	1024,9	2,15	0,92	67,6	111,1
P-value												
Extrusão	0,48	0,55	0,97	0,53	0,16	0,09	0,51	0,31	0,65	0,96	0,1	0,89
Níveis	0,37	0,0008	0,43	0,36	0,01	0,88	0,01	0,16	0,43	0,29	0,23	0,37
Extrusão x Níveis	0,48	0,89	0,01	0,87	0,049	0,43	0,056	0,38	0,35	0,77	0,71	0,81

PSE: erro padrão agrupado; AE antes da extrusão; PE: após extrusão; PT: proteína totais (g dL⁻¹); AL: albumina (g dL⁻¹); GL: glicose (mg L⁻¹); CT: cortisol (ng ml⁻¹)

Tabela 19 – Atividade enzimática alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) de tilápia-do-Nilo alimentada por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiada com cepa inativada de *Streptococcus agalactiae*.

Níveis	30 dias		60 dias		90 dias		3 horas		6 horas		24 horas	
	AST	ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST	ALT
Controle	165,8	31,3	51,2	19,7	37,72	28,6	37,25	32,9 ^B	36,2	31,4	26,9	24,6
250 AE	120	23,4	46,4	16,8	22,58	23,4	44,26	48,6 ^{AB}	31,9	31,4	38,7	21,1
500 AE	75,7	19,6	60,8	23,5	27,8	26,6	52,52	53,4 ^{AB}	27,4	25,6	28,3	22
1000 AE	182,1	38,8	47,5	21,6	34,7	28,1	33,79	27,4 ^{AB}	42	34,6	36,5	23,7
250 PE	148,1	38	43,1	19,5	29	25,7	48,18	42,2 ^{AB}	41,6	36,1	21,5	19,3
500 PE	176,4	38,7	47,3	21,7	36	33,6	38,41	48,9 ^{AB}	34,9	33,3	26,3	20,2
1000 PE	162,9	45,9	39,5	22	49,5	29,8	44,06	55,6 ^A	50,6	31,5	31,6	20,3
PSE	46,6	7,4	8,4	2,2	7,3	4,2	5,6	6,2	5,7	4,4	3,88	2,3
<i>Fator: Extrusão</i>												
Antes	135,9	28,3	51,5	20,4	30,7	26,7	41,95	40,6	34,4	30,8	32,6 ^A	22,8
Após	163,5	38,5	45,3	20,7	38,1	29,4	41,97	44,9	40,8	33	26,6 ^B	21,1
<i>Fator: Níveis</i>												
0	165,8	31,3	51,2	19,7	37,7	28,6	37,25	32,9	36,2	31,4	26,9	24,6
250	134,1	30,7	44,7	18,1	25,8	24,6	46,22	45,4	36,7	33,8	30,1	20,2
500	126	29,1	54,1	22,6	31,9	30,1	45,46	51,2	31,1	29,4	27,3	21,1
1000	172,5	42,4	43,5	21,8	42,1	28,9	38,92	41,5	46,3	33	34	21,9
P-value												
Extrusão	0,41	0,06	0,31	0,82	0,17	0,36	0,99	0,42	0,12	0,48	0,04	0,32
Níveis	0,69	0,29	0,54	0,22	0,17	0,58	0,29	0,01	0,07	0,78	0,29	0,29
Extrusão x Níveis	0,6	0,59	0,86	0,8	0,79	0,85	0,19	0,03	0,83	0,64	0,15	0,91

PSE: erro padrão agrupado

AE antes da extrusão; PE: após extrusão; ALT: alanina aminotransferase (UI L⁻¹); AST: aspartato aminotransferase (UI L⁻¹)

Atividade lisozima

A atividade da lisozima apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos de incorporação do nucleotídeo na ração, sendo menor (5800) quando incorporado antes da extrusão e maior (6614) quando incorporado via *coating* (Tabela 20).

Tabela 20 – Atividade da lisozima ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) de tilápia-do-Nilo alimentada por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiada com cepa inativada de *Streptococcus agalactiae*

Níveis	30 dias	60 dias	90 dias	3 horas	6 horas	24 horas
Controle	4952,4	5734,6	5715,5	5699	5751,1	6044,4
250 AE	5631,7	5034,9	5763,8	6224,7	5970,8	5667,1
500 AE	5852,7	5329,5	5716,8	6005,1	5464,1	5554,2
1000 AE	5413,3	5112,4	5295,2	5900	6080	5936,5
250 PE	5161,9	5385,4	5892,1	5922,8	6085,7	6829,2
500 PE	5258,4	5522,5	5989,8	5440	6245,1	7228,5
1000 PE	5009,5	5436,2	5625,4	5721,9	5884,4	6357,1
PSE	412,9	287,3	407,1	324,9	507	466,8
<i>Fator: Extrusão</i>						
Antes	5462,5	5302,8	5622,8	5957,4	5816,5	5800 ^B
Após	5095,5	5519,7	5805,7	5695,9	5991,6	6614 ^A
<i>Fator: Níveis</i>						
0	4952,4	5734,6	5715,5	5699	5751,1	6044,4
250	5396,8	5210,1	5827,9	6073,8	6028,2	6248,1
500	5555,5	5426	5853,3	5722,5	5854,6	6391,4
1000	5211,4	5274,3	5460,3	5811,4	5982,2	6146,8
P-value						
Extrusão	0,22	0,3	0,53	0,26	0,63	0,01
Níveis	0,52	0,3	0,76	0,66	0,94	0,9
Extrusão x Níveis	0,89	0,92	0,97	0,84	0,79	0,3

PSE: erro padrão agrupado; AE antes da extrusão; PE: após extrusão

Atividade do complemento (via alternativa)

A atividade do complemento não apresentou diferença significativa ao aferir o fator tratamentos (Tabela 21). Quando avaliado o fator níveis (Figura 8), aos 30 dias de alimentação, os peixes que receberam a dieta contendo 250 mg kg^{-1} de nucleotídeo apresentaram um tempo de lise

superior (8,49 min) aos demais níveis e, o menor tempo (5,74 min) foi para os peixes que não receberam o nucleotídeo (Tabela 10).

Em três horas após o desafio bacteriano com a cepa inativada, os peixes que receberam a dieta contendo 500 mg kg⁻¹ apresentaram menor tempo (6,60 min) de lise, já os peixes que receberam a dieta controle e 250 mg kg⁻¹ apresentaram maior tempo (8,18 e 8,16 min respectivamente). Às 24 horas após o desafio, os peixes que receberam a dieta contendo 1.000 mg kg⁻¹ apresentaram menor tempo (6,12 min) de lise e, os peixes que receberam a dieta controle apresentaram maior tempo (7,57 min) para a atividade.

Tabela 21 – Tempo expresso em minutos da atividade do sistema complemento de tilápia-do-Nilo alimentada por 90 dias com dietas suplementadas com nucleotídeo e desafiada com cepa inativada de *Streptococcus agalactiae*

Níveis	30 dias	60 dias	90 dias	3 horas	6 horas	24 horas
Controle	5,74	7,05	6,83	8,18	6,30	7,58
250 AE	9,84	6,56	6,72	7,48	7,30	7,26
500 AE	8,58	7,41	7,45	6,95	6,78	6,02
1000 AE	7,46	6,66	6,24	7,32	8,22	5,51
250 PE	7,14	7,51	5,95	8,86	7,86	7,14
500 PE	6,74	6,93	6,87	6,25	6,37	7,39
1000 PE	7,18	7,02	5,79	6,52	6,48	6,73
PSE	0,79	0,54	0,46	0,5	0,53	0,51
<i>Fator: Extrusão</i>						
Antes	6,72 ^B	7,13	6,36	7,44	6,72	7,22
Após	7,90 ^A	6,91	6,81	7,48	7,15	6,60
<i>Fator: Níveis</i>						
0	5,74 ^B	7,05	6,83	8,18 ^A	6,30	7,57 ^A
250	8,49 ^A	7,06	6,33	8,16 ^A	7,56	7,20 ^{AB}
500	7,66 ^{AB}	7,16	7,16	6,60 ^B	6,57	6,66 ^{AB}
1000	7,37 ^{AB}	6,84	6,01	6,91 ^{AB}	7,35	6,12 ^B
P-value						
Extrusão	0,04	0,59	0,17	0,93	0,06	0,1
Níveis	0,009	0,94	0,07	0,003	0,3	0,049
Extrusão x Níveis	0,27	0,63	0,86	0,87	0,18	0,36

PSE: erro padrão agrupado; AE antes da extrusão; PE: após extrusão

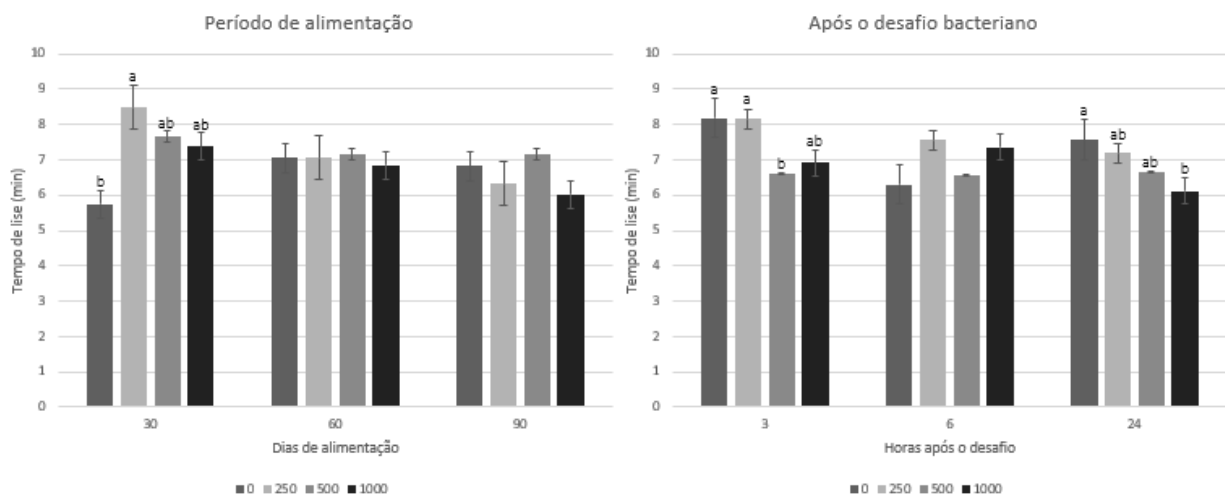


Figura 8 - Atividade do sistema complemento (via alternativa)

Composição corporal

Os peixes escaneados no DXA para avaliação corporal não apresentaram diferença significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 22).

Tabela 22 - Valores para o conteúdo mineral ósseo (CMO), densidade mineral óssea (DMO), massa gorda (MG), massa magra e conteúdo mineral ósseo (MM + CMO), massa total (MT) e lipídeos (LIP) de tilápia-do-Nilo após 90 dias de alimentação com diferentes níveis de inclusão de nucleotídeo.

Níveis	CMO	DMO	MG	MM + CMO	MT	LIP
Controle	9,57	0,166	53,6	372,8	426,4	12,5
250 AE	8,92	0,161	49,5	368,8	418,3	11,7
500 AE	9,08	0,165	49,4	364,5	427,3	11,4
1000 AE	8,79	0,159	46,6	354,5	401,1	11,5
250 PE	9,19	0,16	47,5	377,1	426,4	11,1
500 PE	9,32	0,164	42,4	398,9	424,6	9,5
1000 PE	9,14	0,16	51,2	383,2	434,4	11,7
PSE	0,53	0,005	7,06	18,06	22	1,39
<i>Fator: Extrusão</i>						
Antes	9,09	0,163	49,8	365,1	418,3	11,8
Após	9,31	0,163	48,7	383	431,7	11,2
<i>Fator: Níveis</i>						
0	9,57	0,166	53,6	372,8	426,4	12,5
250	9,05	0,16	48,5	372,9	421,4	11,4

500	9,2	0,16	45,9	381,7	434,3	10,5
1000	8,97	0,16	48,9	368,9	417,7	11,6
P-value						
Extrusão	0,57	0,93	0,82	0,17	0,39	0,56
Níveis	0,68	0,56	0,75	0,9	0,88	0,54
Extrusão x Níveis	0,98	0,99	0,87	0,74	0,88	0,87

PSE: erro padrão agrupado; AE: antes da extrusão; PE: após a extrusão.

A avaliação da composição do filé pelo método de análise química não apresentou diferença significativa entre os fatores níveis e método de inclusão (Tabela 23).

Tabela 23 - Composição corporal (%) por avaliação bromatológica.

	Umidade	Proteína	Extrato Etéreo	Matéria Mineral
Controle	79,04	16,98	1,75	3,25
250 AE	78,83	15,86	1,26	3,63
500 AE	79,46	16,12	1,48	2,92
1000 AE	78,93	16,63	1,69	3,86
250 PE	79,02	16,13	1,84	3,94
500 PE	79,25	15,99	1,70	2,87
1000 PE	79,26	16,41	2,78	3,45
PSE	0,28	0,55	0,31	0,39
<i>Fator: Extrusão</i>				
Antes	79,14	16,38	2,02	3,38
Após	79,07	16,40	1,55	3,41
<i>Fator: Níveis</i>				
0	79,04	16,98	1,75	3,25
250	78,92	16,00	1,55	3,79
500	79,36	16,06	1,59	2,90
1000	79,10	16,52	2,24	3,65
P-value				
Níveis	0,49	0,2882	0,15	0,13
Extrusão	0,71	0,9612	0,0506	0,9
Níveis x Extrusão	0,79	0,9732	0,36	0,83

PSE: erro padrão agrupado; AE: antes da extrusão; PE: após a extrusão.

Sobrevivência após desafio bacteriano com *Streptococcus agalactiae* vivo

Ao final do período de alimentação (90 dias), foi avaliado a sobrevivência dos peixes desafiados com injeção intraperitoneal de *S. agalactiae*. O tratamento controle apresentou 6,67% de sobrevivência; suplementação de 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo na forma extrusada 3,33%; suplementação de 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo na forma extrusada 0,00%; suplementação de 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo na forma extrusada 0,00%; suplementação de 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo via *coating* 3,33%; suplementação de 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo via *coating* 0,00%; suplementação de 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo via *coating* 3,33%. A figura 9 apresenta o gráfico de sobrevivência diária dos peixes ao serem inoculados com o patógeno.

Análise de Sobrevivência

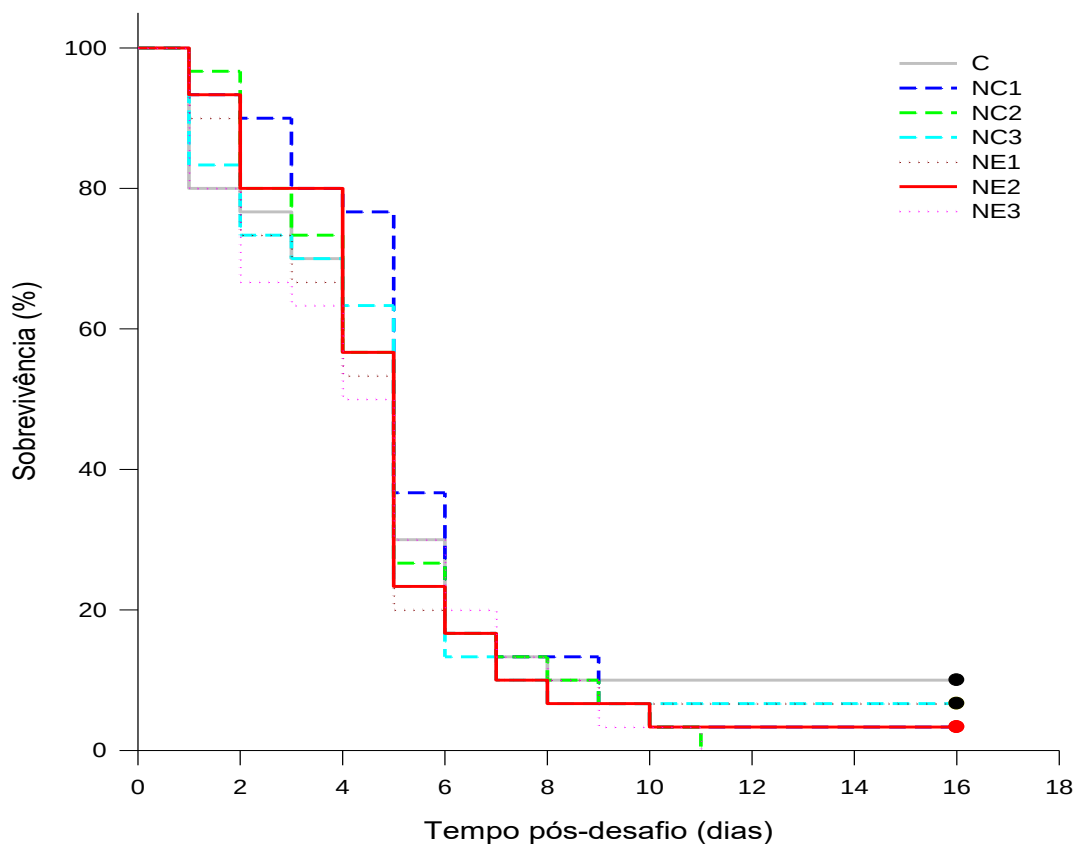


Figura 9 – Sobrevivência de tilápia-do-Nilo desafiada contra *Streptococcus agalactiae* via intraperitoneal. C: controle; dietas suplementadas com nucleotídeo posterior a extrusão: NC1 (250 mg kg⁻¹), NC2 (500 mg kg⁻¹) e NC3 (1.000 mg kg⁻¹); dietas suplementadas com nucleotídeo anterior a extrusão: NE1 (250 mg kg⁻¹) NE2 (500 mg kg⁻¹) e NE3 (1.000 mg kg⁻¹).

Não houve diferença significativa na porcentagem de mortalidade após o desafio entre os diferentes grupos experimentais. A elevada porcentagem de mortalidade pode estar associada a uma mudança brusca de temperatura logo após o desafio, causada pela chegada de uma frente fria. Uma vez que o biotério é parcialmente aberto e, não pode fazer uso de um sistema de recirculação de água para esse tipo de experimentação e, não temos sistema de aquecimento para todas as unidades experimentais.

Os peixes apresentam sinais clínicos característicos da doença e ao ser constatada a morte, foi realizado o isolamento bacteriano do rim e cérebro, confirmando a infecção bacteriana. Portanto, a condição adversa apresentada pode ter contribuído para a ação da bactéria, uma vez que ambos são fatores estressantes para o animal.

Discussão

Este estudo testou diferentes níveis de inclusão de RNA como fonte de nucleotídeos dietéticos para a tilápia-do-Nilo antes e após a extrusão da ração, avaliando os parâmetros de desempenho produtivo, hematológicos e imunológicos durante o período de alimentação e após o desafio bacteriano contra *Streptococcus agalactiae*. No decorrer dos 90 dias de administração das dietas com nucleotídeo, os peixes se alimentaram bem e não sofreram estresse, como demonstra o ganho em peso em todos os grupos. Pode isso estar relacionado as boas condições de temperatura da água como demonstrado nas variáveis limnológicas.

O efeito estimulador de crescimento promovido pela ingestão de nucleotídeos na dieta é dependente do conteúdo de adenina livre, que é um potente inibidor da ingestão de alimentos e do crescimento (RUMSEY et al., 1992). Isso está diretamente relacionado a fonte de extração do nucleotídeo ofertado. Além disso, fatores como o estágio de desenvolvimento do animal, a espécie e o nível de suplementação do nucleotídeo podem levar a um evento positivo ou até mesmo negativo no crescimento (OLIVA-TELES et al., 2006; LI et al., 2007). Assim, como neste estudo, Barros et al., (2015) não observaram efeito no crescimento da tilápia alimentada com nucleotídeo dietético.

Os peixes alimentados com a dieta controle (sem o nucleotídeo) e os peixes alimentados com 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo apresentaram maior quantidade de gordura visceral e a inclusão

de 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo promoveu menor depósito de gordura visceral nas tilápias. Li et al., (2005) observaram que a inclusão do composto de nucleotídeos *Optimûn* (Chemoforma, Basel, Suíça), elevou significativamente o conteúdo lipídico no corpo em redfish (*Sciaenops ocellatus*).

Alguns autores relatam que a suplementação dietética de nucleotídeo pode afetar a composição corporal dos peixes, com incremento de proteínas no corpo, aumento no conteúdo lipídico e aumento do teor de cinzas, resultados que demonstram a uma eficiente suplementação dietética (LI et al., 2005; HOSSAIN et al., 2016; HOSSAIN et al., 2020). Contudo, esses autores avaliaram esses parâmetros por métodos convencionais, através da eutanásia dos animais para análise da composição corporal. Utilizando o aparelho de absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA), é possível avaliar a porcentagem lipídica do corpo todo e a densidade óssea sem causar a morte do animal (JOHNSON et al., 2017). Contudo, em nosso estudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Informações sobre mudanças em vários lipídios e minerais nos tecidos de peixes em resposta suplementação dietética de nucleotídeo associados a consequências fisiológicas devem ser mais exploradas (HOSSAIN et al., 2020).

Avaliações hematológicas são essenciais para determinação do estado nutricional, contrações, toxicidade e seu impacto no sistema circulatório em organismos aquáticos (KORD et al., 2021). Durante o período de alimentação, não houve alterações na contagem de eritrócitos (RBC), hematócrito (HT), hemoglobina (HG) e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM), com todos os valores dentro da faixa normal para a espécie (BARROS et al., 2015). Após serem desafiados, os peixes apresentaram alterações hematológicas. Alguns autores relataram que a suplementação dietética com nucleotídeo, em diferentes espécies de peixes, resulta em alterações no RBC e HG, sugerindo um papel significativo na absorção de ferro desempenhado pelo nucleotídeo (CHOUDHURY et al., 2005; TAHMASEBI-KOHYANI et al., 2012; HOSSAIN 2020).

As proteínas totais e a albumina são importantes para avaliar a resposta imunológica em peixes e essenciais para manter um sistema imunológico saudável (KADER et al., 2018; KORD et al., 2021). Durante o período de alimentação, esses parâmetros se mantiveram estáveis e dentro dos valores considerados normais para a tilápia (BARROS et al., 2015). Ao serem submetidas ao estresse de um desafio bacteriano, os peixes alimentados com 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo após a extrusão apresentaram um aumento no valor de proteínas totais após seis horas. Para albumina,

com três horas após o desafio, a suplementação dietética de 500 e 1.000 mg kg⁻¹, para ambos os métodos de incorporação ocasionaram um aumento significativo nesta variável. Foi demonstrado que as proteínas séricas totais e a albumina tendem a aumentar com a suplementação de nucleotídeo devido a seu efeito imunomodulador (KADER et al., 2018; REDA et al., 2018). Isso corrobora com a hipótese de que a suplementação exógena de nucleotídeo se torna efetiva quando os peixes são expostos a condições adversas (GUO et al., 2019) no nosso caso, um desafio bacteriano.

Condições de estresse são comumente avaliadas através da mensuração dos indicadores como a glicose e o cortisol no soro. A redução no nível de glicose pela suplementação de nucleotídeo na dieta pode indicar uma melhora da condição fisiológica do peixe (HOSSAN et al., 2020), o que foi observado nos peixes alimentados com dieta suplementada com 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo por 60 dias. Contudo, o efeito benéfico não foi observado após o desafio bacteriano. Nessa condição, os peixes passam por um período maior de estresse, necessitando de energia extra, e como consequência, a glicose sérica pode sofrer picos de elevação por curtos períodos para suprir essa demanda (BARROS et al., 2014).

A atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) é indicador plasmático da integridade hepática e avalia o estado de saúde do fígado, com valores baixos considerados ideais (HOSSAN et al., 2020). Durante o período de alimentação, a ALT e AST não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Mas 24 após o desafio o valor de AST para as dietas em que o nucleotídeo foi incorporado após a extrusão foi menor. Hassan et al., (2018) relataram que 15 g kg⁻¹ de extrato de levedura na dieta reduziu os níveis de ALT e AST na tilápia-do-Nilo, o que indica uma melhora na atividade hepática. Contudo, em nosso estudo, quando a suplementação foi de 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo após a extrusão, os peixes apresentaram maior atividade da ALT três horas após serem desafiados. Neste caso, a suplementação dietética de nucleotídeo em níveis menores que 1.000 mg kg⁻¹ é favorável para a manutenção da saúde hepática da tilápia. No entanto, são necessárias análises complementares para afirmar o grau de lesão no fígado (de LIMA et al., 2020). Levando em consideração que esses parâmetros podem indicar o estado de higidez do fígado, a suplementação da dieta com nucleotídeo também refletiu no índice hepatossomático (IHS) em que peixes que receberam a dieta contendo 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo apresentaram menor porcentagem no IHS.

A atividade respiratória dos leucócitos (burst), representa um papel essencial na resposta imunológica, e se mostrou promissora nos primeiros 30 dias de alimentação, apresentando maior atividade nos peixes alimentados com dieta suplementada com 1.000 mg kg^{-1} de nucleotídeo. Contudo, após o desafio bacteriano, a dieta sem adição de nucleotídeo apresentou maior atividade respiratória dos leucócitos. A suplementação dietética com imunomodulador pode apresentar efeito antagônico quando a dose e o tempo de administração não são adequados (LI et al., 2004). A administração da dieta por 90 dias, associado ao estresse pelo desafio no final do experimento pode ter causado a redução da respiração dos leucócitos, todavia, mais estudos são necessários para explorar quais vias são ativadas pelo imunomodulador durante a explosão respiratória de leucócitos (BARROS et al., 2015).

A primeira linha de defesa dos peixes é o sistema imunológico não específico, no qual estão presentes a lisozima, enzima antibacteriana presente nos tecidos e em todos os fluidos corpóreos e o sistema complemento, cuja ativação é possível através de três vias: alternativa, das lectinas e a clássica (TANG et al., 2020; DING et al., 2021). A suplementação de imunomodulador pode normalizar ou modular processos fisiológicos ligados ao sistema imunológico (HOSEINIFAR et al., 2020). Durante o período de alimentação, os peixes não apresentaram diferença significativa na atividade da lisozima. Após 24 horas do desafio bacteriano, os peixes que receberam as dietas suplementadas com nucleotídeo após a extrusão apresentaram maior atividade da lisozima, indicando uma melhor resposta imunológica. A maior atividade de lisozima sérica está associada às propriedades imunomoduladoras do nucleotídeo, ligado ao aumento do número de fagócitos que secretam essa enzima (KADER et al., 2018).

Durante o período de alimentação, não houve alterações na ativação do sistema complemento. Essa condição é significativamente adequada, uma vez que a ativação do complemento pela via alternativa é independente de anticorpos. Ela ocorre através do contato direto com microrganismos estranhos no início de uma infecção e, é de grande importância para a resposta imune inata em peixes (URIBE et al., 2011). Contudo, três e 24 horas após o desafio bacteriano, os peixes que receberam a dieta controle apresentaram maior ativação desse sistema. Alguns autores relatam que o nucleotídeo dietético em excesso tem inibido as respostas imunológicas dos peixes (SAKAI et al., 2001; WELKER et al., 2011; HOSSAIN et al., 2016; LI et al., 2017). O aproveitamento na síntese e metabolismo do nucleotídeo dietético está diretamente ligado a espécie de peixe e hábito alimentar. Estudos com espécies carnívoras como alguns

salmonídeos, tem mostrado bons resultados com a suplementação de nucleotídeo, já nas espécies onívoras e herbívoras, como a tilápia, *catfish*, carpas, tem sido observado uma maior variação (WELKER et al., 2011; HOSSAIN et al., 2020).

Embora não seja essencial, a suplementação dietética de nucleotídeos pode compensar uma demanda metabólica em situações que interferem na homeostase dos peixes (LI e GATLIN, 2006; WELKER et al., 2011). Após o desafio com *S. agalactiae*, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Além disso, houve uma alta taxa de mortalidade, a qual pode ter sido ocasionada pela redução da temperatura em decorrência de uma frente fria, ocorrida logo após a inoculação dos peixes, uma vez que o sistema possui entrada constante de água e não há controle da temperatura. Contudo, a suplementação de nucleotídeo não foi capaz de conter o estresse, que foi intenso. Anguiano et al., (2011), relataram que a suplementação com níveis elevados de nucleotídeos (2.000 mg kg^{-1}) não promoveu maior sobrevivência em tilápias quando desafiadas contra *S. inae*. Bricknell & Dalmo (2005) afirmaram que o uso prolongado do produto nem sempre confere melhor resposta imunológica. Em nosso estudo, o nível mais alto foi de 1.000 mg kg^{-1} e, também mostrou não incrementar a resposta imunológica da tilápia após desafio com a bactéria inativada. Além disso, o período de alimentação dos peixes com as dietas foi de 90 dias, o qual parece ser muito extenso para esta espécie.

Conclusão

A suplementação dietética de nucleotídeo corrobora com a não essencialidade quando os animais apresentam homeostase. A incorporação do nucleotídeo anterior ou após a extrusão apresentaram resultados similares em diversos fatores avaliados. Ao desafiar os animais contra *S. agalactiae*, a suplementação exógena de 500 mg kg^{-1} de nucleotídeo apresenta condições bioquímicas que proporcionam higidez para tilápia-do-Nilo.

Referências

- ABREU, J. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Brazilian Journal of Biology*, v.69, n.4, p.1133-1139. 2009. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000500018>.
- ANGUIANO, M. Effects of dietary nucleotides on growth, immunology, and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thesis of master, Texas A&M University. 2011.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 18^a ed. Gaithersburg, Maryland, USA, 2005.
- BARROS, M. M.; FALCON, D. R.; ORSI, R. O.; PEZZATO, L. E.; FERNANDES JR, A. C.; GUIMARÃES, I. G.; FERNANDES JR, A.; PADOVANI, C. R.; SARTORI, M. M. P. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed b-glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish & Shellfish Immunology*. v.39, n.188 – 195. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.004>.
- BARROS, M. M.; GUIMARÃES, I. G.; PEZZATO, L. E.; ORSI, R. O.; JUNIOR, A. C. F.; TEIXEIRA, C. P.; FLEURI, L. F.; PADOVANI, C. R. The effects of dietary nucleotide mixture on growth performance, haematological and immunological parameters of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, v.46, p.987-993. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12229>.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; SAITA, M. V.; GIMBO, R. Y.; 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. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>.
- CHOUDHURY, A.; PIERCE, M. E.; NGUYEN, D.; STORACE, L.; CONFALONE, P. N. Synthesis of D-D4FC, a biologically active nucleoside via an unprecedented palladium mediated ferrier rearrangement-type glycosidation with an aromatization prone xylo-furanoid glycol. *Tetrahedron Letters*, v.46, p.8099–8102. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.09.139>.
- COLLIER, H. B. The standardization of blood hemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, v.50, n.6, p.550-552. 1944.
- De LIMA, S. A.; PDREIRA, A. C. O.; De FREITAS, J. M. A.; DALMASO, A. C. S.; CHIELLA, R. J.; MEURER, F.; ROMÃO, S.; BOMBARDELLI, R. A. Diets containing purified nucleotides reduce oxidative stress, interfere with reproduction, and promote growth in Nile tilapia females. *Aquaculture*, v.528, p.735509. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735509>.
- DING, Z.; HONG, J.; GUO, W.; LI, G.; ZHAO, Z.; CHOU, Y.; WANG, S.; SUN, Y.; LI, J.; ZHANG, D.; ZHOU, Y. The screen herbal immunopotentiator and research on its effect on the innate immune system and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, v.541. p.736778. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736778>
- ELLIS, A. E. Lysozyme assays. in: STOLEN J. S.; FLETCHER, T. C.; ANDERSON, D. P.; ROBERSON, B. S.; MUISWINKEL, W. B. (eds) Techniques in fish immunology. Sos Publications, 101–103. 1990.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal of Clinical Pathology*, v.56, n.1, p.35-39. 1971. <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, v.125, p.1401–1412. 1995.

HASSAAN, M. D.; MAHMOUD, S. A.; JARMOLOWICZ, S.; EL-HAROUN, E. R.; MOHAMMADY, E. Y.; DAVIES, S. J. Effects of dietary baker's yeast extract on the growth, blood indices and histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, v.24, p.1709-1717. 2018. <https://doi.org/10.1111/anu.12805>.

HESS, J. R.; GREENBERG, N. A. The Role of nucleotides in the immune and gastrointestinal systems: Potential clinical applications. *Nutrition in Clinical Practice*, v.27, p.281–294. 2012. <https://doi.org/10.1177/0884533611434933>.

HOSEINIFAR, S. H.; SUN, Y. Z.; ZHOU, Z.; VAN DOAN, H.; DAVIES, S. J.; HARIKRISHNAN, R. Boosting immune function and disease bio-control through environment-friendly and sustainable approaches in finfish aquaculture: herbal therapy scenarios, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, v.28, n.3, p.303-321. 2020. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1731420>.

HOSSAIN, M. S.; KOSHI, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; SONY, N. M. Dietary nucleotide administration influences growth, immune responses and oxidative stress resistance of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture*, v.455, p.41-49. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.008>.

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

JOHNSON, M. S.; WATTS, R. J.; HAMMER, H. S.; NAGY, T. R.; WATTS, S. A. Validation of Dual-energy X-ray Absorptiometry to Predict Body Composition of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.48, n.1. p.122-131. 2017. <https://doi.org/10.1111/jwas.12324>

JMP® Software is as follows: JMP®, Version . SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2021.

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

KONG, W.; HUANG, S.; YANG, Z.; SHI, F.; FENG, Y.; KHATOON, Z. Fish feed quality is a key factor in impacting aquaculture water environment: evidence from incubator experiments. *Scientific Reports*, v.10, n.187. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57063-w>

KORD, M. I.; SROUR, T. M.; OMAR, E. A.; FARAG, A. A.; NOUR, A. A. M.; KHALIL, H. S. The immunostimulatory effects of commercial feed additives on growth performance, non-specific immune response, antioxidants assay, and intestinal morphometry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Frontiers in Physiology*. v.12, p.1-12. 2021. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.627499>

KREUTZ, L. C.; PIETRETTI, D.; DOMENICO, J. di. Imunoestimulantes para uso na aquicultura. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; CUNHA, M. A. Farmacologia aplicada a aquicultura. Santa Maria, RS: Ed, UFSM. 2017.

LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D. M. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid striped bass, *Morone chrysops* × *M. saxatilis*, and elevated levamisole in vitro impairs macrophage function. *Aquaculture Research*, v.35, n.14, p.1380-1383. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01151.x>

LI, P., BURR, G.S., GOFF, J., WHITEMAN, K.W., DAVIS, K.B., VEGA, R.R., NEILL, W.H., GATLIN, D.M. A preliminary study on the effects of dietary supplementation of brewers yeast and nucleotides, singularly or in combination, on juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture Research*, v.36, p.1120-1127. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01333.x>.

LI, P., GATLIN, D.M., III, 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture*, v.251, p.141-152. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.009>

LI, P.; GATLIN III, D. M.; NEILL W. M. Dietary supplementation of a purified nucleotide mixture transiently enhanced growth and feed utilization of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Journal World Aquaculture Society*, v.38, p.281–286. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00096.x>

LIU, Y. ZHANG, Y. JIANG, W. WANG, J. PAN, X. WU, W. Nucleic acids digestion by enzymes in the stomach of snakehead (*Channa argus*) and banded grouper (*Epinephelus awoara*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.43, p.127–136. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0273-8>.

NAKANISHI T.; KIRYU I.; OTOTAKE M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine*, v.20, p.3764-3769, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00291-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00291-8).

OLIVA-TELES, A.; GUEDES, M. J.; VACHOT, C.; KAUSHIK S. J. The effect of nucleic acids on growth, ureagenesis and nitrogen excretion of gilthead sea bream *Sparus aurata* juveniles. *Aquaculture*, v.253, p.608–617. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.010>.

RANZANI-PAIVA, M. J.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, 140p. 2013.

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

RUMSEY, G. L.; WINFREE, R. A.; HUGHES S. G. Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v.108, p.97–110. 1992.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, v.172, n.1–2, p.63–92. 1999. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00436-0](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00436-0).

SAKAI, M. TANIGUCHI, K. MAMOTO, K. OGAWA, H. TABATA, M. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, v.24, p.433–438. 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00314.x>.

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

TAHMASEBI-KOBYANI, A.; KEYVANSKOOH, S.; NEMATOLLAHI, A.; MAHMOUDI, N.; PASHA-ZANOOSI, H. Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.431–440. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9524-x>.

TANG, Y.; XIN, G.; ZHAO, L. M.; HUANG, L.X.; QIN, Y. X.; SU, Y.Q.; ZHENG, W. Q.; WU, B.; LIN, N.; YAN, Q. P. Novel insights into host-pathogen interactions of large yellow croakers (*Larimichthys crocea*) and pathogenic bacterium *Pseudomonas plecoglossicida* using time-resolved dual RNA-seq of infected spleens. *Zoological Research*, v.41, n.3, p.314–327. 2020. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.035>.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (*Characidae*, *Byconinae*). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, v.38, n.2-3, p.209–215. 2006.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, v.56, n.10, p.486–503. 2011. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>

WELKER, T.L., LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., KLESIUS, P.H. Effects of dietary supplementation of a purified nucleotide mixture on immune function and disease and stress resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture Research*, v.42, n.12, p.1878–1889. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02794.x>

ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C.; RISE, M. L.; HALL, J. R.; NASH, G. W.; GAMPERL, A. K. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, v.435, 1–9. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.010>.

SOBREVIVÊNCIA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM DIETA SUPLEMENTADA COM NUCLEOTÍDEO E DESAFIADA COM *Streptococcus agalactiae* SOROTIPO NÃO TIPÁVEL

Introdução

A busca por uma alimentação mais saudável contribui para tornar os peixes uma das principais fontes de proteína consumida, favorecendo o crescimento da aquicultura (ESTAIANO DE REZENDE et al., 2021). Para atender essa demanda, práticas de intensificação da produção têm sido implementadas. No entanto, o adensamento animal pode resultar em condições estressantes e tornar o animal susceptível as doenças e, consequentemente causar impacto ambiental e econômico (BAYLISS et al., 2017).

Com o intuito de minimizar as perdas na produção, o uso de antimicrobianos, muitas vezes de forma errônea, se torna uma prática comum, ação essa que pode resultar em cepas com resistência aos principais antimicrobianos disponíveis (LIU et al., 2019; SETIJANINGSIH et al., 2021). A fim de evitar prejuízos tanto ao animal quanto ao ambiente e consumidor, a busca por alternativas que incrementem a saúde dos peixes, como a adição de suplementos (prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e imunomoduladores) tem ganhado destaque na aquicultura.

O uso de imunomoduladores é uma estratégia para melhorar as respostas de defesa do organismo. Promovem o equilíbrio da comunidade microbiana gastrointestinal e o aumento da produção de enzimas digestíveis, o que por consequência pode promover melhor o desempenho do animal, por melhorar seu estado de saúde (AMENYOGBE et al., 2020; KORD et al., 2021).

Um dos imunomoduladores de destaque na aquicultura mundial são os nucleotídeos, compostos de baixo peso molecular com funções importantes em quase todos os processos biológicos (GIL, 2002). São considerados não essenciais, pois o animal pode produzi-los pela síntese de novo. Contudo, é um processo energeticamente caro e, em momentos cruciais, como em uma infecção ou estresse severo, a síntese de novo pode não satisfazer a demanda energética do animal (GUO et al., 2019).

Adicionar imunoestimulantes à ração é um método eficaz para melhorar o sistema imunológico não específico (IRKIN & YIGIT 2015). A incorporação do nucleotídeo à ração deve ser realizada de forma eficaz para que não ocorra degradação do produto antes de sua ingestão. A

principal forma de comercialização da ração é extrusada, processo no qual os ingredientes misturados passam pelo processamento em que recebem umidade, pressão e calor. Ao incorporar um aditivo a ração, deve-se atentar as propriedades do produto para que não sofra degradação no processamento ou lixiviação durante a utilização (OBIRIKORANG et al., 2015).

A tilápia-do-Nilo é a espécie mais produzida no Brasil e o segundo grupo de peixe mais produzido no mundo, presente em pelo menos 78 países (de LIMA et al., 2020). Um dos desafios da tilapicultura são as doenças que podem ocorrer durante todas as fases do ciclo de produção. Dentre os patógenos que mais causam prejuízos na tilapicultura mundial, em todas as fases de criação, encontra-se o *Streptococcus agalactiae* responsável por causar septicemia e meningoencefalite. A ação dessa bactéria em um ambiente de produção ocasiona elevada taxa de mortalidade e grandes prejuízos, tanto econômico quanto ambiental (CAO et al., 2022).

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência da tilápia-do-Nilo alimentada com dieta contendo diferentes níveis de nucleotídeo incorporado à dieta antes ou após a extrusão e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* sorotipo não tipável.

Materiais e métodos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp, campus de Jaboticabal.

O protocolo utilizado neste experimento está de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado em 11 de abril de 2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP protocolo nº 004605/19.

Delineamento experimental

Para execução do experimento, foram utilizados 210 juvenis de tilápia-do-Nilo saudáveis provenientes de piscicultura comercial, com peso médio de $21,70 \pm 0,54$ g e comprimento total médio de $10,74 \pm 0,33$ cm. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 21 unidades experimentais de 310 L, com aeração constante e sistema de renovação de água independente. Foi acoplado um termostato (Aqua One® 300W) em cada unidade experimental e a temperatura ($27,7 \pm 1,2$ °C) monitorada diariamente com termômetro digital. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente e o delineamento experimental utilizado foi o fatorial 2x4 com três níveis de

suplementação de fonte de nucleotídeo e uma dieta controle (sem adição do produto) e, duas metodologias de incorporação. Para cada tratamento foram utilizadas três réplicas. Após 10 dias de aclimação utilizando-se a dieta controle, iniciou-se a alimentação com as dietas experimentais, as quais foram fornecidas três vezes ao dia (9h, 13h e 17h) *ad libitum*, por um período de 32 dias.

Dieta experimental

Foi formulada uma dieta isoproteica e isonérgica com suplementação vitamínica e mineral completa (Tabela 1). Com base na revisão bibliográfica, foram determinados os níveis de inclusão de 250, 500 e 1.000 mg kg⁻¹ de RNA extraído da levedura celular de *Saccharomyces cerevisiae*, como fonte de nucleotídeos (Biotide Extra®, Biorigin, Brasil) com dois métodos de incorporação na ração: antes da extrusão e após a extrusão. Foi utilizada uma dieta idêntica as demais, todavia, sem adição do nucleotídeo, denominada de controle.

A ração foi processada no Instituto de Pesca em São José do Rio Preto – SP. Os ingredientes selecionados (Tabela 1) foram moídos a 0,6 mm e extrusados em extrusora Ferraz modelo E62, a secagem realizada em secador tubular rotativo contínuo. As rações denominadas N1 (250 mg kg⁻¹), N2 (500 mg kg⁻¹) e N3 (1.000 mg kg⁻¹) receberam o composto com RNA – fonte de nucleotídeos – anterior a extrusão. O restante foi processado sem adição do produto e denominada Controle. Parte da ração controle foi conduzida para a fábrica de ração da Unesp para adição do nucleotídeo via *coating*, denominada N1 (250 mg kg⁻¹), N5 (500 mg kg⁻¹) e N6 (1.000 mg kg⁻¹). A fonte de nucleotídeo foi adicionada na ração e misturada por 15 min em um misturador tipo Y, posteriormente, adicionou-se 2% de CMC diluído em água (3:1000) e homogeneizado por mais 15 min. As rações foram secas em temperatura ambiente, embaladas e armazenadas em sala refrigerada.

As dietas foram analisadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA/CAUNESP/FCAV). A proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl, o teor de extrato etéreo pelo método de hidrólise ácida e o material mineral determinado pela queima em forno mufla a 550°C, todos de acordo com a metodologia da AOAC (2005).

Tabela 1 – Composição formulada da dieta com valores calculados e composição analisada para Proteína Bruta, Extrato Etéreo e Matéria Mineral.

Composição da dieta (%)	
Milho grão	31,16
Farelo de soja	25,00
Farelo de trigo	16,77
Quirera de arroz	5,00
Farinha de vísceras	9,40
Farinha de penas	7,90
Farinha de carne e ossos	2,50
Óleo de soja	1,00
Premix	0,30
L-lisina	0,95
Antioxidante	0,02
Total	100,00
Valores fornecidos calculados	
Proteína digestível	27,36
Energia bruta	4197,39
Energia digestível	3059,99
Cálcio	0,81
Fósforo	0,44

Composição química analisada							
	C	N1	N2	N3	N4	N5	N6
Proteína Bruta	30,20	30,28	29,94	30,66	30,41	29,54	30,41
Extrato etéreo	5,27	5,38	5,02	5,45	5,46	5,59	5,44
Matéria mineral	8,03	8,00	8,12	7,64	7,90	8,15	7,65

C: controle sem nucleotídeo; N1: 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo anterior a extrusão; N2: 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo anterior a extrusão; N3: 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo anterior a extrusão; N4: 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo posterior a extrusão; N5: 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo posterior a extrusão; N6: 1.000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo posterior a extrusão.

Desempenho produtivo

Ao final do período experimental foi realizada uma biometria antes do desafio bacteriano. Os valores obtidos foram tabulados a fim da obtenção dos dados de desempenho produtivo: peso final médio (PF (g)); comprimento final médio (CFM (cm)); ganho em peso (GP (g) = peso final – peso inicial); conversão alimentar aparente (CAA = alimento fornecido (g) / ganho em peso (g)).

Desafio bacteriano

Ao final do período experimental, os peixes foram avaliados quanto à sua resistência contra *Streptococcus agalactiae* através de injeção intraperitoneal, com $2,5 \times 10^7$ UFC da bactéria, estabelecida previamente em ensaio de DL50%. A cepa bacteriana utilizada, proveniente da coleção do LAPOA, isolada de tilápia-do-Nilo (cepa 45P), identificada por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (número de acesso do GenBank KJ561066) foi cultivada em meio BHI (Brain Heart Infusion, KASV, K25-1400) e incubada a 28°C por 48 horas em estufa de crescimento. Antes da incubação, o meio foi centrifugado por 10 minutos a 4°C a rotação de 3.000 G em centrífuga refrigerada modelo Eppendorf 5804 R. As células bacterianas foram lavadas duas vezes com tampão PBS (0,01 M) sob as mesmas condições e suspenso no mesmo tampão. O comportamento dos peixes, os sinais clínicos e mortalidade diária foram avaliadas durante 15 dias após a infecção. O rim e o cérebro de peixes recém-mortos de cada tratamento foram utilizados para o reisolamento da bactéria, para confirmação da infecção.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de modelo fatorial 2x4. Quando observado significância para os fatores, as médias foram diferenciadas com o teste Student-T, e quando houve interação dos fatores, todas as médias dos tratamentos foram analisadas com Tukey-HSD. Quando apresentou interação entre os fatores e os fatores de forma independente, apenas a interação foi considerada. Os dados foram analisados com o software JMP 14.0 (SAS Institute, CA, USA).

Resultados e Discussão

Um dos benefícios da incorporação de nucleotídeos à dieta dos peixes é promover o crescimento. Em nosso estudo, os tratamentos não apresentaram diferença significativa para o desempenho produtivo ($P > 0,05$). Na avaliação do fator níveis, os peixes alimentados com 1.000 mg kg⁻¹ de RNA como fonte de nucleotídeos apresentaram melhores resultados ($P < 0,05$) para o peso final médio (PFM), comprimento total final médio (CTFM), comprimento padrão final médio (CPFM) e ganho em peso (GPD) (Tabela 2). Já o grupo alimentado com 250 mg kg⁻¹ de RNA,

apresentou menor PFM, CTFM e CPM. O GPM foi menor nos peixes alimentados com a dieta controle e nas dietas suplementadas com 250 mg kg⁻¹.

Quanto ao método de incorporação do aditivo, os peixes que receberam as dietas com a suplementação do RNA anterior a extrusão, apresentaram maior PFM e GPD. Isso demonstra que a incorporação do aditivo antes da extrusão da ração pode ser realizada com segurança, sem que ocorra degradação do produto. Já a adição do produto após a extrusão pode ter uma quantidade perdida para a água por lixiviação, pois os nucleotídeos são hidrossolúveis, portanto, se faz necessário o uso de aglutinantes que protejam a molécula na ração.

Tabela 2 – Desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo após 30 dias de alimentação com dietas suplementadas com nucleotídeo.

	PIM	PFM	CTIM	CPIM	CTFM	CPFM	GPD	CAA
Controle	21,41	90,39	10,63	8,37	16,54	13,16	2,47	1,05
250 AE	21,43	90,30	10,60	8,49	16,27	13,12	2,48	1,01
500 AE	21,62	95,36	10,78	8,50	16,82	13,37	2,63	1,01
1000 AE	22,08	102,35	10,86	8,53	17,22	13,72	2,84	1,08
250 PE	21,76	85,54	10,69	8,40	16,33	13,03	2,34	1,02
500 PE	21,45	92,49	10,42	8,43	16,61	13,28	2,55	1,06
1000 PE	22,16	92,02	10,87	8,38	16,68	13,27	2,54	1,08
PSE	0,31	2,5	0,13	0,08	0,15	0,11	0,07	0,02
Extrusão								
AE	21,63	94,6 ^A	10,71	8,47	16,71	13,34	2,6 ^A	1,03
PE	21,69	90,11 ^B	10,65	8,39	16,54	13,18	2,47 ^B	1,05
PSE	0,15	1,25	0,06	0,04	0,07	0,05	0,03	0,01
Níveis	0,16	0,01	0,23	0,67	0,006	0,0127	0,008	0,12
Extrusão	0,79	0,02	0,5	0,2	0,14	0,0763	0,02	0,45
Níveis x Extrusão	0,88	0,24	0,37	0,82	0,26	0,27	0,26	0,79

PIM: peso inicial médio (g); PFM: peso final médio (g); CTIM: comprimento total inicial médio (cm); CPIM: comprimento padrão inicial médio (cm); CTFM: comprimento total final médio (cm); CPM: comprimento padrão final médio (cm); GPD: ganho em peso diário (g); CAA: conversão alimentar aparente; AE: anterior a extrusão; PE: posterior a extrusão; PSE: erro padrão agrupado

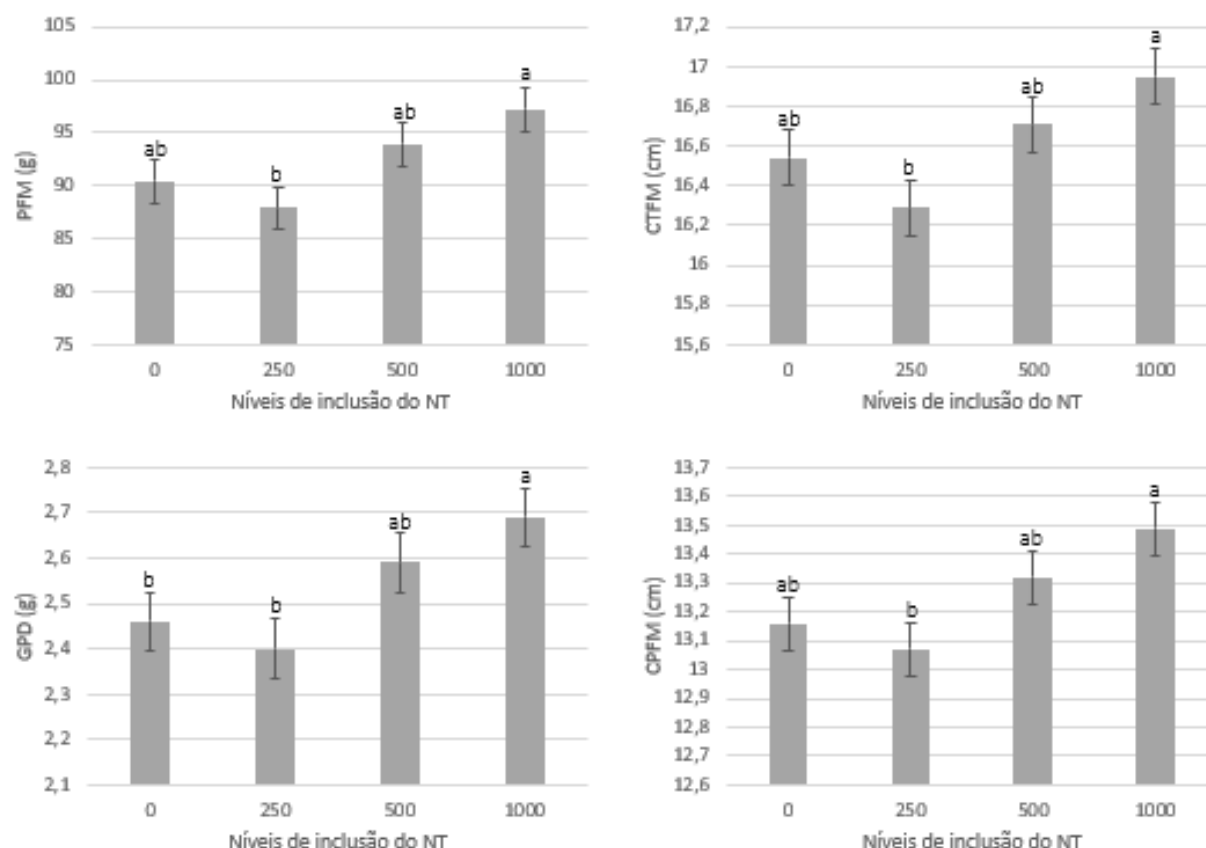


Gráfico 1 – Análise do fator níveis de inclusão de nucleotídeo. Peso Final Médio (PFM); Comprimento Total Final Médio (CTFM); Ganho em Peso Diário (GPD) e Comprimento Padrão Final Médio (CPFM) de tilápia-do-Nilo alimentada por 30 dias com dietas suplementadas com nucleotídeos.

A demanda pela suplementação exógena de nucleotídeo nas fases iniciais de desenvolvimento dos peixes pode estar associada à sua alta taxa de replicação celular (BORDA et al., 2003). A suplementação de 200 mg kg⁻¹ de monofosfato de inosina (IMP - nucleosídeo) em dietas purificadas foi capaz de promover o crescimento de tilápia-do-Nilo (ASADUZZAMAN et al., 2017). Kader et al., (2018) relatam que a inclusão de IMP melhora o desempenho produtivo, respostas imunes e metabólicas da tilápia-do-Nilo e, apesar de não observarem diferença significativa quando desafiadas contra *S. agalactiae*, os peixes que receberam as dietas com IMP apresentaram maior sobrevivência cumulativa.

Entre os objetivos da suplementação dietética de nucleotídeos, busca-se a melhora na resistência à patógenos pelo aumento da resposta imune inata dos peixes (LI & GATLIN, 2006). Após 30 dias de alimentação, os peixes foram desafiados com injeção intraperitoneal de *Streptococcus agalactiae* e o comportamento, sinais clínicos e mortalidade foram avaliados por um período de 15 dias. A partir do quarto dia após o desafio, os peixes apresentaram sinais clínicos característicos da estreptococose, tais como letargia, natação errática, exoftalmia, ascite, hemorragia por toda a superfície corporal e corrosão das nadadeiras. A mortalidade foi registrada diariamente (Figura 1). Após a morte recente dos peixes, foi realizado o isolamento bacteriano do rim e do cérebro dos peixes, confirmando a infecção pela *S. agalactiae*. A sobrevivência em 15 dias após o desafio bacteriano não apresentou diferença significativa ($P>0,05$), além disso, a taxa de sobrevivência foi menor que 40%, dada a virulência da cepa de *S. agalactiae* não tipável.

A *S. agalactiae* é um patógeno com biologia multiforme, continuamente emergente e suscetível a alterações genômicas que passaram a ser perceptíveis a partir da técnica de tipagem de sequência multilocus (CHEN, 2019). Há evidências de que os grupos de *S. agalactiae* estão se diversificando e evoluindo mais rapidamente, onde encontramos cepas de diferentes grupos e cepas não tipáveis. Essa diversidade genética representa uma preocupação ao desenvolvimento de produtos eficazes para conter a bactéria, além da possibilidade de adaptação a novos hospedeiros (BARONY et al., 2017). Essa evolução pode ser associada a grande expansão da aquicultura nas últimas décadas. Portanto, faz-se necessária entender as características metabólicas, adaptativas e patogenicidade das cepas e relação com o hospedeiro (TAVARES et al., 2019).

Diversos estudos têm sido conduzidos para avaliar o desempenho produtivo e ação imunomoduladora de nucleotídeos dietéticos. A resposta à ingestão do imunomodulador está relacionada a fonte de extração do nucleotídeo, a espécie alvo e a um fator que fere a homeostase do animal, como a infecção bacteriana. Shiau et al., (2015) não observaram efeito no crescimento de tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) após suplementação dietética com nucleotídeo, contudo, ao serem desafiadas contra *Streptococcus iniae*, a suplementação (Rovimax NX, DSM Nutrition Products, Basel, Suíça) com 120 e 240 mg kg⁻¹ proporcionou maior sobrevivência em comparação ao grupo que recebeu a dieta controle. Resultado semelhante foi observado por Reda et al., (2018), que relataram maior sobrevivência da tilápia-do-Nilo alimentada com dieta contendo 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo (Nucleoforce Fish™, Bioiberica, Espanha) e desafiadas contra *Aeromonas sobria*. No entanto, é importante ressaltar que pode ocorrer uma

maior taxa de mortalidade nos peixes alimentados com dietas suplementadas com níveis elevados de nucleotídeo, o que pode estar relacionado com a sobrecarga de compostos nitrogenados no fígado, os quais afetam o metabolismo e a susceptibilidade a infecções (WELKER et al., 2011; ANGUIANO, 2011; BARROS et al., 2015). Além disso, a sorotipagem genômica é uma técnica mais atual e, são escassas as informações referentes a cepas de *S. agalactiae* não tipável.

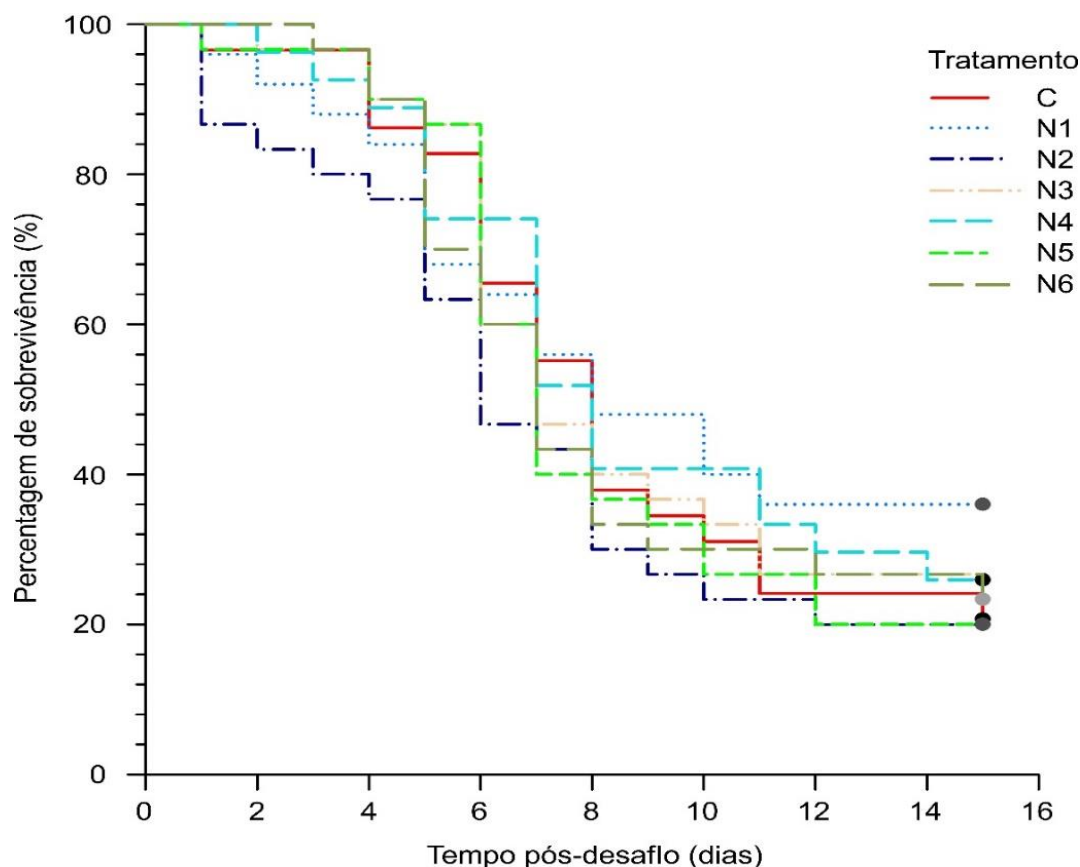


Figura 1 - Sobrevivência por tratamento da tilápia-do-Nilo desafiadas contra *Streptococcus agalactiae* via intraperitoneal observada por 15 dias: C: tratamento controle 20,7%; N1: suplementação de 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo anterior a extrusão 29,6%; N2: suplementação de 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo antes da extrusão 20,0%; N3: suplementação de 1000 mg kg⁻¹ de nucleotídeo antes da extrusão 23,3%; N4: suplementação de 250 mg kg⁻¹ de nucleotídeo após a extrusão 25,9%; N5: suplementação de 500 mg kg⁻¹ de nucleotídeo após a extrusão 20,0%; N6: suplementação de 100 mg kg⁻¹ de nucleotídeo após a extrusão 23,3%.

O custo da suplementação dietética com nucleotídeo pode ser uma limitação para sua aplicação na produção de peixes (HOSSAIN et al., 2020). Portanto, é necessário o estabelecimento do nível correto de incorporação, visto que níveis elevados além de aumentar os custos de produção podem não trazer benefício à saúde dos peixes. Outro fator que deve ser levado em consideração é a forma de inclusão do nucleotídeo à ração, para que este não seja degradado durante o

processamento, ou perdido por lixiviação na água, e também que seja entregue na porção intestinal responsável pela absorção.

Conclusão

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

.

Considerações finais

Com a intensificação da aquicultura, aumentam-se os riscos sanitários relacionados ao manejo inadequado, que contribuem para a imunossupressão dos organismos aquáticos.

A tilápia-do Nilo é a espécie de peixe mais produzida no Brasil e de representação mundial. Uma das principais causas de mortalidade na produção de tilápia está relacionada ao surto de doenças bacterianas, causadas principalmente pelo gênero *Streptococcus*, o qual tem causado grandes prejuízos econômicos em vários países. Com base nisso, realizamos este estudo, que teve como objetivo principal estudar um aditivo (nucleotídeo) que pudesse incrementar a resposta imunológica da tilápia-do-Nilo através da suplementação dietética.

Na literatura, é possível encontrar diversos estudos com resultados positivos, que utilizaram imunomoduladores na suplementação dietética de peixes. Esses aditivos, como probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, entre outros, podem ser extraídos de ingredientes de origem vegetal ou animal. Os resultados observados nos estudos divergem com relação ao desempenho produtivo, ação imunomoduladora, metabolismo do animal, entre outras. Além da fonte de extração dos aditivos, a espécie estudada, a idade do animal e tempo de administração na dieta são fatores que definem a eficácia do produto. Podemos constatar neste estudo, diferentes respostas da tilápia-do-Nilo ao serem alimentadas com dietas suplementadas com nucleotídeos e forma de incorporação do mesmo à ração, de acordo com a fase de desenvolvimento.

Um fator que nos chamou atenção, ao submeter os peixes ao desafio bacteriano foi o uso de uma cepa de *Streptococcus agalactiae* não tipável. A *S. agalactiae* é um patógeno que acomete humanos, bovinos e peixes. Estudos recentes, realizados a partir do genoma dessa bactéria tem mostrado sua evolução e capacidade de adaptação a novos hospedeiros e, representa um grande risco as demais espécies animais. O uso indiscriminado de antimicrobianos, principalmente como preventivo, contribui para a adaptação e evolução de cepas bacterianas, tornando-as resistentes a esses produtos. Outro fator é o controle de surtos bacterianos causados por esta bactéria, uma vez que os antimicrobianos comumente utilizados podem não ser efetivos para todos os sorotipos. Portanto, estratégias de prevenção, aliadas ao manejo e bem-estar animal são aliados contra o desenvolvimento de patógenos mais resistentes e surtos de doenças na produção aquícola. A incorporação de nucleotídeo na dieta da tilápia-do-Nilo pode ser uma eficiente estratégia de prevenção de surtos de estreptococose, contudo, protocolos de aplicação direcionados ao tempo de administração e idade dos animais devem ser otimizados.