UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA

IMUNOMODULAÇÃO POR ACTIGEN® EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO PRODUTIVO APÓS DESAFIO COM LPS

Natalia Ha
Zootecnista

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA

IMUNOMODULAÇÃO POR ACTIGEN® EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO PRODUTIVO APÓS DESAFIO COM LPS

Natalia Ha

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi

Co-Orientadora: Dra. Jaqueline Dalbello Biller Takahashi

Dissertação apresentada ao Câmpus Experimental de Dracena, UNESP – como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvida pela Biblioteca do Campus Experimental de Dracena

H111i

Ha, Natalia.

Imunomodulação por Actigen® em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): respostas fisiológicas e desempenho produtivo após desafio com LPS / Natalia Ha. – Dracena: [s.n.], 2015

76 f. il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Campus Experimental de Dracena. Área de conhecimento: Produção Animal, 2015.

Orientadora: Leonardo Susumu Takahashi
Coorientador: Jaqueline Dalbello Biller Takahashi

1. Peixe -- Criação. 2. Tilápia-do-Nilo. 3. Tilápia (Peixe).

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Imunomodulação por Actigen em Tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus): Respostas fisiológias e desempenho produtivo após desafio com LPS

AUTORA: NATALIA HA
ORIENTADOR: Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER TAKAHASHI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal , Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER TAKAHASHI
Câmpus Experimental de Dracena / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Prof. Dr. URBANO DOS SANTOS RUIZ
Câmpus Experimental de Dracena / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI
Centro de Aquicultura / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Data da realização: 02 de março de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NATALIA HA – nascida em São Paulo, no dia 18 de fevereiro de 1989, ingressou no curso de bacharelado em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista – UNESP - Campus de Dracena (SP) em agosto de 2007, obtendo o grau de zootecnista em julho de 2012. Durante sua graduação executou uma iniciação científica sob orientação do Prof. Leonardo Susumu Takahashi. Em março de 2013, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", mestrado interunidades, campus de Dracena e Ilha Solteira, e em março de 2015 submeteu a sua dissertação à banca examinadora.

Aos meus pais Afonso e Sabina...

Aos meus irmãos Viviane e Stéfano, e cunhado Márcio...

Às minhas sobrinhas Milenna e Mariana...

Por todo amor, apoio, dedicação e carinho...

Ao André pelo apoio, companheirismo, incentivo e carinho...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado, guiando e iluminando o meu caminho com muito amor.

Ao Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi e a Profa. Dra. Jaqueline Dalbello Biller-Takahashi pela orientação, ensinamentos, amizade, dedicação e paciência.

Ao Prof. Dr. Urbano dos Santos Ruiz, Prof. Fábio Ermínio Mingatto, Profa. Dra. Maria Luiza Poiatti e Profa. Dra.Fabiana Pilarski pelas valiosas sugestões e participação na banca avaliadora e de qualificação.

A Alltech® pelo auxílio financeiro e doação do produto testado.

A todos os professores, funcionários, técnicos de laboratório, seguranças da Unesp, campus de Dracena e de Ilha Solteira, em especial a Ariane, Jaque Ribas, Lana Cobra e Graciele Perez, pelos ensinamentos e colaboração nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Fábio E. Mingato, pela disponibilidade do uso do LaBMeT - Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica da Unesp Dracena.

A Profa. Dra. Wilma A. Starke-Buzetti, pela disponibilidade do uso do Laboratório de Imunoparasitologia de Ilha Solteira e à equipe do laboratório Diogo Tiago da Silva e Maria Luana Alves pela ajuda.

Ao Grupo de Aquicultura da Unesp de Dracena - GAUD, por toda ajuda, trabalho em equipe e amizade (André, Bacaxi, Biskuit, Capô, Chagas, Luana, Marmota, Mikaely, Pecado, Pelego, Rathiufly, Saque, Thais, Xica, Xorão, Prof. Dr. Celso Tadao, Profa. Dra. Jaqueline D. Biller-Takahashi e Prof. Dr. Leonardo S. Takahashi).

A Aline Sapienza, Clara Park, Erikelly Santana, Gabriela Chang, Hyllana Medeiros, Larissa Ramos, Mariana Nagata, Michele Pires, Paula Chang e Tina Shin pela amizade, apoio e carinho.

A todos os meus familiares e amigos que ajudaram direta ou indiretamente nesta etapa, através de conselhos, amizades, conversas.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Nutrição e Saúde de Peixes 3
2.2 Actigen® 9
2.3 Lipopolissacarídeos (LPS) 12
2.4 Modelo biológico 13
3 REFERÊNCIAS 14

CAPÍTULO 2 - IMUNOMODULAÇÃO POR ACTIGEN® EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO PRODUTIVO APÓS DESAFIO COM LPS
RESUMO 26
ABSTRACT 27
1 INTRODUÇÃO 28
2 MATERIAL E MÉTODOS 29
2.1 Instalações e qualidade da água 29
2.2 Dietas experimentais 29
2.3 Experimento 1 30
2.3.1 Delineamento experimental 30
2.3.2 Análises imunológicas, hematológicas e bioquímicas 31
2.3.3 Desempenho zootécnico 36
2.4 Experimento 2 37
2.4.1 Desafio por lipopolissacarídeos (LPS) 37
2.4.2 Análises imunológicas, hematológicas e bioquímicas 37
2.5 Delineamento e análises estatísticas 38
3 RESULTADOS 38
3.1 Experimento 1 38
3.1.1 Parâmetros imunológicos 38
3.1.2 Parâmetros hematológicos 40
3.1.3 Desempenho zootécnico 44
3.2 Experimento 2 45
3.2.1 Parâmetros imunológicos 45
3.2.2 Parâmetros hematológicos 48
4. DISCUSSÕES 51
4.1 Parâmetros imunológicos 51
4.2 Parâmetros hematológicos 55
4.3 Desempenho zootécnico 61
5 CONCLUSÃO 64
6 REFERÊNCIAS 64

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus Experimental de Dracena

Comissão de Ética em Uso de Animais

Certificado

Tendo em vista o Protocolo CEUA 21/2014, certificamos que o Projeto intitulado **"Inclusão Imunomodulação por actigen em tilápia do Nilo (*oreochromis niloticus*): Respostas fisiológicas e desempenho produtivo após desafio com LPS" (Imunomodulação by actgem in tilápia (*oreochromis niloticus*): Phisiological and productive performance after LPS challenge)**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Leonardo Susumu Takahashi** está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA, do Curso de Graduação em Zootecnia, do Câmpus Experimental de Dracena – UNESP, e foi aprovado pela referida Comissão.

Dracena, 10 de junho de 2014.

Profa. Dra. SIRLEI APARECIDA MAESTÁ
Presidente da Comissão de Ética em Uso de Animais

Seção Técnica de Apoio Acadêmico - STAAc
Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651 Bairro das Antas CEP 17900-000 Dracena São Paulo Brasil
Tel. (18) 3821-8200 Fax. (18) 3821-8208 - academico@dracena.unesp.br

IMUNOMODULAÇÃO POR ACTIGEN® EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO PRODUTIVO APÓS DESAFIO COM LPS

RESUMO - Actigen® (ACT) é um prebiótico contendo frações ativas de mananoproteínas (FAMP) e devido ao seu papel na imunomodulação melhora o desempenho produtivo e a saúde intestinal. As frações ativas de mananoproteínas que são derivadas da parede celular e podem ser facilmente adicionados à dieta dos peixes. A sua administração nos sistemas de produção de peixes têm promovido melhores índices de desempenho além de compensar os efeitos indesejáveis do estresse, comuns na piscicultura. Os estudos dos efeitos da administração de FAMP em dietas para peixes ainda são recentes, principalmente com relação à padronização da forma de administração, dosagem e regime alimentar para cada espécie. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ACT sobre o desempenho zootécnico, respostas imunológicas e fisiológicas em tilápia-do-Nilo após desafio com o lipopolissacarídeo (LPS). O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Unesp de Dracena, onde foram utilizados 288 juvenis de tilápias (12 animais/caixa) e foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (0%; 0,04%; 0,06% e 0,08% de ACT) e 6 repetições. Foram realizados dois experimento, sendo que no primeiro foram realizadas duas biometrias aos 30 e 60 dias de experimento, com coletas de amostras de sangue de dois peixes por caixa em cada período. O segundo experimento foi realizado após os 60 dias, no qual os peixes foram desafiados com injeção intraperitoneal com LPS e após 5 e 12 dias da inoculação, foram coletadas amostras sanguíneas de dois peixes por caixa. Foram avaliados o desempenho zootécnico, parâmetros imunológicos, hematológicos e bioquímicos. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), pelo programa estatístico SAS, versão 9.0. O uso de frações ativas de mananoproteínas apresentou efeitos positivos sobre os parâmetros imunológicos, indicando uma possível ação benéfica a fim de melhorar o estado de saúde em peixes, entretanto ainda há a necessidade de mais estudos para um melhor entendimento sobre seus efeitos nos mecanismos de defesa e desempenho.

Palavras-chave: Frações ativas de mananoproteínas, imunomodulador, prebiótico, peixe

"IMMUNOMODULATION BY ACTIGEN® IN TILAPIA (O*reochromis niloticus*): PHYSIOLOGICAL RESPOSNSE AND PRODUCTIVE PERFORMANCE AFTER LPS CHALLENGE"

ABSTRACT - Actigen® is a prebiotic containing active fractions of mannan rich proteins and due to its role in immunomodulation improves growth performance and intestinal health. The active fractions of mannan rich proteins are derived from the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, easily added to the diet of fish, and their use in fish production systems has promoted better performance indices beyong compensating the common undesirable effects of stress in fish farming. Studies of the effects of active fractions of mannan rich proteins in diets for fish are still recent especially regard the standardization of administration route, dosage and diet for each species. The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of ACT on the immune responses of livestock, physiological and performance of Nile tilapia after challenge with lipopolysaccharide (LPS). The experiment was carried out in the Aquaculture Laboratory of UNESP, Dracena, where 288 juvenile tilapia (12 animals/box) were used in a completely randomized design with 4 treatments (0%, 0.04%, 0.06% and 0.08% ACT) and 6 replications. Two experiments were conducted, in the first were two biometrics at 30 and 60 days of experiment, with collections of two fish blood samples per box in each period. The second experiment was carried out after 60 days, in which the fish were challenged by intraperitoneal injection with LPS and after 5 and 12 days after inoculation, blood samples were collected from two fish per box. The growth performance, immunological, hematological and biochemical parameters were measured. The results obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means compared by Tukey test (5%), using the statistical program SAS, version 9.0. The active fractions of mannan rich proteins administration showed some positive effects on the immune parameters, indicating a possible beneficial action in order to improve performance and health in fish, though some results have been contradictory, and still need more studies to a better understanding of its effects in defense and performance mechanisms.

Keywords: Active fractions of mannan rich proteins, immunomodulation, prebiotic, fish

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

As substâncias que adicionadas à dieta dos peixes reduzem os efeitos nocivos do estresse e favorecem de alguma forma os mecanismos de defesa são classificadas como imunoestimulantes (SAKAI, 1999), os quais são considerados substâncias biológicas que auxiliam beneficamente os mecanismos específicos e não específicos de defesa dos animais (CHAGAS et al., 2009). São agrupados em fatores nutricionais, como as vitaminas, substâncias derivadas de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, além de substâncias químicas sintéticas. O emprego dessas substâncias na dieta dos peixes favorece as respostas de defesa frente às infecções (SAKAI, 1999; VAINIKKA et al., 2005), sendo uma alternativa ao uso de quimioterápicos na aquicultura (VERSCHUERE et al., 2000).

Os prebióticos são seletivamente fermentados por microrganismos benéficos da microbiota gastrintestinal, o que reduz, por competição, a carga de bactérias indesejáveis do trato digestório, favorecendo a saúde do animal e melhorando a absorção dos nutrientes da dieta. Dentre estes, a levedura íntegra e seus derivados, como a levedura autolisada e componentes da parede celular, principalmente o β-glucano e o mananoligossacarídeo (MOS) são amplamente avaliados como aditivo alimentar em dietas animais (WELKER et al., 2007; SADO et al., 2008; TORRECILLAS et al., 2012; HUU; JONES, 2014). O Actigen® (ACT, Alltech, Nickolasville, KY,USA) é também um prebiótico e contém mananoligossacarídeo (MOS) (HOOGE; CONNOLLY, 2011). Os componentes da parede celular agregam efeitos imunomoduladores e prebióticos à dieta (WELKER et al., 2007).

Na piscicultura, os animais estão submetidos aos efeitos do estresse, que é comumente consequência do manejo zootécnico a que os animais são submetidos e ao desequilíbrio do ambiente, o que leva a condições de imunossupressão que facilita o aparecimento de infecções parasitárias e bacterianas. A maioria das doenças bacterianas em peixes é causada por bactérias Gram negativas, que possuem lipopolissacarídeos (LPS) como componentes estruturais de sua parede.

As doenças são responsáveis por grandes perdas na aquicultura mundial (WRIGHT et al., 1990).

A atual produção mundial de pescado está em torno de 126 milhões de toneladas e a do Brasil foi de aproximadamente dois milhões de toneladas (levantamento preliminar de 2013), sendo 40% proveniente de pescado cultivado (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014). A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram as espécies mais cultivadas em 2011, correspondendo a 67% da aquicultura continental. O tambacu, a carpa (*Cyprinus carpio*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) também têm destaque, somando 20,1% do total (ANUALPEC, 2014).

Para os peixes que são mantidos em confinamento o alimento natural se torna escasso, necessitando assim de uma ração nutricionalmente completa e balanceada (ROTTA, 2003), uma vez que as condições nutricionais têm papel preponderante sobre o sistema imune e, este desempenha um papel de grande importância na defesa do organismo contra a invasão e estabelecimento de muitas doenças em ambiente estressante (DÜGENCI et al., 2003).

No Brasil, os estudos sobre o sistema imune de peixes são escassos, mas os benefícios com uso de imunoestimulantes e prebióticos já foram avaliados em diversas espécies aquáticas (TORRECILLAS et al., 2011; TORRECILLAS et al., 2012; LIU et al., 2013; BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014; TORRECILLAS et al., 2015). Os estudos dos efeitos da administração de mananoligossacarídeos em dietas para peixes ainda são recentes principalmente com relação à padronização da forma de administração, dosagem e regime alimentar para cada espécie. Entretanto, os resultados sobre o sistema imune, tais como o aumento da resistência do hospedeiro e a modulação dos mecanismos de defesa específicos e não específicos contra organismos patógenos oportunistas (GALINDO-VILLEGA; HOSOKAWA, 2004), bem como a maximização da eficiência produtiva, com a melhora dos custos e da rentabilidade são indicativos que este imunoestimulante deve ser profundamente avaliado (GATLIN III et al., 2006; SAKAI, 1999).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar as respostas de fisiológicas, imunológicas e desempenho produtivo em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com diferentes concentrações de Actigen®, após desafio com LPS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES

O crescimento da aquicultura promoveu uma maior intensificação dos sistemas de criação, resultando em mudanças na qualidade da água e manejo excessivo dos peixes, como a captura e o transporte, o que gera consequências negativas sobre o desempenho zootécnico, resposta imune e susceptibilidade a doenças causadas por agentes como bactérias, fungos, vírus e parasitos (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2000; BARTON et al., 2000; BRANDÃO et al., 2006). Por isso, manter as boas práticas de manejo para manter a saúde dos peixes é essencial para o sucesso da piscicultura (STOSKOPF, 1993; WOO; BRUNO, 1998).

A nutrição é importante nos sistemas de criação intensiva, para manutenção do crescimento e da saúde dos organismos aquáticos (CHAGAS et al., 2009), pois animais alimentados com rações desbalanceadas ou mal nutridos são susceptíveis às bactérias patogênicas e oportunistas (STOSKOPF, 1993; WOO; BRUNO, 1998). A dieta também pode influenciar nos parâmetros imunológicos e na capacidade do animal de resistir a doenças infecciosas (ALCORN et al., 2003; BLAZER, 1991; LALL, 2000; LANDOLT, 1989; SITJA-BOBADILLA; PÉREZ-SANCHEZ, 1999). A utilização de alimentos funcionais é uma estratégia para combater os agentes patogênicos, pois favorecem a nutrição, aumentam a eficiência alimentar e a taxa de crescimento, associado muitas vezes à melhoria na saúde destes animais influenciando positivamente a resistência. Dentre estes alimentos utilizados na aquicultura, os imunonutrientes (vitaminas e minerais), imunoestimulantes, prebióticos e probióticos são os mais utilizados (OLIVEIRA et al., 2002). Estes compostos são de fácil administração e apresentam baixa toxicidade para o hospedeiro, podendo ser administrados por meio de imersão, injeção ou como um aditivo na dieta (SMITH et al., 2003).

Os imunoestimulantes têm apresentado grande importância nos últimos anos, tanto em peixes como em outros animais, pois são substâncias ou microrganismos capazes de modular o sistema imune, não só evitando a ocorrência de doenças,

como também contribuindo para a melhora do ambiente aquático, promovendo assim melhores índices de desempenho zootécnico e, consequentemente, melhorando a viabilidade econômica (CEROZI, 2012). Os imunoestimulantes e adjuvantes utilizados em vacinas para peixes oferecem uma alternativa aos medicamentos, produtos químicos e antibióticos usados na piscicultura para controle de doenças. Diferentes compostos biológicos e sintéticos ajudam a melhorar o sistema não específico em peixes e mostraram aumentar a barreira contra a infecção por uma série de microrganismos (ANDERSON, 1992, RAA et al., 1992, JENEY; ANDERSON, 1993, SAKAI, 1999; RAA, 2000).

Os estudos de hematologia também são comumente utilizados como diretrizes ou indicadores do seu estado funcional (SCHRECK; MOYLE, 1990). A hematologia estuda a morfologia, bioquímica, função das células sanguíneas, os órgãos em que são produzidas e o efeito de doenças em tais parâmetros (SOIVIO; NIKINMAA, 1981). A variação nas características hematológicas em peixes depende da espécie, idade, sexo, alimentação e ambiente a que estão expostos (SUN et al., 1992; SERPUNIN; LIKHATCHYOVA, 1998). Portanto, constitui importante característica a ser analisada quando os animais são expostos a produtos químicos (RANZANI-PAIVA et al., 1987), ao estresse (MARTINS et al., 2004a), a infecções (BENLI; YILDIS, 2004) e a parasitos (TAVARES-DIAS et al., 2002a, b; MARTINS et al., 2004b).

Os prebióticos são ingredientes não digestíveis da dieta que afetam positivamente o hospedeiro, estimulando de forma seletiva o crescimento e a atividade de bactérias benéficas existentes no trato gastrointestinal, consequentemente melhorando a saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Apenas são classificadas como prebióticos as substâncias que não podem ser hidrolisadas ou absorvidas na parte superior do trato gastrointestinal, e deve ser um substrato seletivo para bactérias comensais benéficas do cólon, afetando o crescimento ou o metabolismo, podendo alterar a microbiota intestinal e induzir efeitos benéficos intestinais ou sistêmicos ao hospedeiro (DIONIZIO et al., 2002). Os prebióticos podem atuar indiretamente sobre o sistema imune e enzimático, com o estímulo do crescimento das populações de bactérias benéficas. Estas bactérias podem produzir substâncias com propriedades imunoestimulantes, bem como

interagir com o sistema imune através da produção de citocinas, o que induz a proliferação de células mononucleares, a fagocitose, a eliminação e indução de síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas (SILVA; NORNBERG, 2003).

Os aditivos alimentares, como vitaminas, lipídios ou alto teor de carboidratos podem ou não aumentar os parâmetros inatos, mas ainda podem melhorar o crescimento e a sobrevivência (ORTUNO et al., 2001; LYGREN et al., 1999). Há um interesse considerável em hiperregular o sistema imune inato com a ajuda de vários imunoestimulantes. Os que são comumente usados são os componentes que ativam o mecanismo de reconhecimento de padrões do sistema inato como os glucanos (origem vegetal, fúngica e leveduras), peptidoglicanos de bactérias gram-negativas e positivas, os lipopolissacarídeos de membrana (LPS) que são comuns a todas as bactérias Gram negativas, e vários carboidratos como levamisol, lactoferrina, ácido polimanurônico, quitinas e quitosana, oligossacarídeos (WANG; WANG, 1997; JIAN; WU, 2004).

Os oligossacarídeos, polímeros de dois a dez monômeros de monossacarídeos, são os frutoligossacarídeos (FOS), encontrado em fontes vegetais; o mananoligossacarídeo (MOS), extraído da parede celular de *Saccharomyces cerevisae*; o galactoligossacarídeo (GOS), que consiste de uma cadeia pequena de moléculas de galactose; o xiloligossacarídeo (XOS), constituído por unidades de xilose e extraído industrialmente de materiais lignocelulósicos, e a inulina, um polímero de frutose obtida de fontes vegetais (SADO, 2008). Dentre estes, o MOS tem ganhado a atenção na piscicultura e vem sendo largamente utilizado na nutrição animal (GATESOUPE, 1999; SAKAI, 1999; RAA, 2000; GATLIN et al., 2006).

Durante os processos de proliferação microbiana, as bactérias aderem-se às células epiteliais, ligando-se a elas por meio de uma fímbria em sítios de ligação específicos ricos em resíduos de manose (MILES, 1993). Os prebióticos têm a capacidade de usar essa semelhança entre os sítios de ligação dos enterócitos ricos em manose com os MOS adicionados à dieta, disponível para adesão bacteriana, adsorvendo os patógenos e impedindo sua ligação à parede intestinal e facilitando a sua expulsão com o quimo alimentar através do trato gastrintestinal por mecanismos fisiológicos normais (FLEMMING, 2005).

A competição por nutrientes não ocorre entre o animal e a bactéria e, sim, entre as bactérias intestinais pelos seus nutrientes específicos (PELICANO et al., 2002). Quando não ocorre a aderência das bactérias aos enterócitos, não há formação de colônias que indisponibilizam nutrientes para o animal ou infeccionam suas células intestinais (FERKET; PARKS; GRIMES, 2002). A escassez desses nutrientes disponíveis na luz intestinal para metabolismo pelas bactérias patogênicas é um fator limitante de manutenção delas nesse ambiente (MACARI; FURLAN, 2005), resultando em um aumento da integridade das vilosidades intestinais, resultando em melhora da saúde intestinal e um melhor aproveitamento dos nutrientes (NEWMAN, 2007; PELICANO et al., 2005).

O sistema imune dos peixes assemelha-se ao sistema imune dos mamíferos, e apresenta-se de forma complexa e eficiente para combate às doenças e na prevenção da propagação de infecções (ZELIKOFF, 1998; BEAMAN et al., 1999; ZELIKOFF et al., 2000). O sistema imune é dividido em inato e adquirido, o primeiro consiste na primeira barreira de defesa contra agentes invasores, atuando de forma inespecífica contra padrões moleculares relacionados a microrganismos (Pamps – Pathogen Associated Molecular Patterns). Já o sistema adquirido necessita de prévio contato para aumento da produção de anticorpos específicos, além de promover memória imunológica (SUNYER; LAMBRIS, 1998).

Após a administração de imunoestimulantes ocorre um aumento dos componentes de defesa, pois o sistema imune inespecífico dos peixes reconhece substâncias exógenas por meio de receptores existentes nas células de defesa, identificam proteínas e moléculas características de microrganismos e que não são encontradas na superfície celular de organismos multicelulares (MAGNADÓTTIR, 2006). O MOS apresenta moléculas características de microrganismos que são reconhecidas pelo sistema imune, iniciando respostas inatas, e auxiliando na ativação da produção de anticorpos contra microrganismos de forma mais eficaz (CETIN et al., 2005).

O sistema inato ou não específico se apresenta como imunidade humoral e imunidade celular. Os componentes inatos humorais são os fatores inibidores do crescimento de bactérias, encontrados no muco, soro e ovos de peixes, como a transferrina, anti-proteases, a lisozima, a proteína C reativa, peptídeos

antibacterianos e proteínas do sistema complemento (ELLIS, 1999, MAGNADOTTIR et al., 2011).

O sistema complemento é um dos mecanismos mais importantes, uma vez que atua nos processos biológicos de fagocitose, quimiotaxia de leucócitos, funções pró-inflamatórias e de opsonização. (ELLIS, 1999; MAGNADOTTIR et al., 2011). É composto por um grande número de proteínas citoplasmáticas e de membrana que se apresentam normalmente inativos no organismo, e sua ativação ocorre de maneira sequencial, após um estímulo inicial em que cada componente contribui para a proteólise do próximo componente a ser ativado. Esta ativação pode ocorrer por três vias: alternativa, lítica (vias das manoses) e clássica. A via alternativa é mais ativa em peixes do que em mamíferos, e ocorre por meio do reconhecimento de microrganismos de forma não específica. A via lítica pode ser ativada pela ligação com a manose da superfície dos microrganismos, e a via clássica depende da interação antígeno-anticorpo, sendo este um mecanismo específico de defesa (NAKAO; YANO, 1998; SAKAI, 1992; MATSUSHITA et al., 1998; SUNYER; LAMBRIS, 1998).

A lisozima é uma enzima lítica de origem leucocitária que possui capacidade de promover proteção contra invasões de microrganismos. Embora associada, principalmente, com a defesa contra as bactérias Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas também podem ser lisadas por esta enzima. A lisozima também é conhecida por ter o mecanismo de opsonização e ativa o sistema complemento e os fagócitos (JOLLES; JOLLES, 1984; GRINDE et al., 1989). Está presente no muco, no tecido linfoide, no plasma e em outros fluídos corporais da maioria das espécies de peixes (YOUSIF et al., 1994; GRINDE et al., 1989). Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e diversas outras espécies marinhas, como a haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), badejo do Alasca (*Theragra chalcogramma*) e wolffish (*Anarhichas lupus*) mostraram pouca atividade ou nenhuma lisozima em seus tecidos ou fluídos corporais (FANGE et al., 1976).

A imunidade celular ocorre através de diversas células de defesa como os trombócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas, que vão atuar na lise e eliminação de patógenos intracelulares nos peixes (SECOMBES, 1996).

Os trombócitos de peixes são células completas, diferente de mamíferos, em que as plaquetas são fragmentos de células (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os trombócitos são encontrados no sangue de répteis, aves e anfíbios, só que apresentando funções de hemostasia e homeostasia (BELETTI et al., 1998). Em peixes, essas células possuem outras funções, entre elas, sugere-se que respondam a situações mórbidas de modo semelhante às plaquetas de mamíferos (STOSKOPF, 1993). São consideradas células de defesa, pois possuem capacidade de fagocitose, e por possuir sustâncias como a fosfatase ácida e estarem presentes em exsudatos inflamatórios (PENHA et al., 1996; TAVARES-DIAS et al., 1999).

Nos peixes teleósteos, os neutrófilos são predominantemente arredondados, cujo citoplasma possui granulações neutrofílicas finas, com núcleo geralmente na forma de bastonete, ocasionalmente segmentado (TAVARES-DIAS et al. 2002a, b). Os neutrófilos são componentes do sistema imunológico que formam a primeira linha de defesa celular contra agentes invasores e têm como função a fagocitose. Os monócitos são células com função fagocitária e de eliminação de bactérias, considerados células em trânsito no sangue e, durante o processo inflamatório, migram para o tecido conjuntivo onde se transformam em macrófagos. São células grandes, tem formas variadas e apresentam núcleo volumoso, ocupando aproximadamente dois terços da célula, e apresentam citoplasma com vacúolos. Os linfócitos nos peixes tem sua função dependente da adaptação da membrana lipoproteica; portanto, a composição dos ácidos graxos e a temperatura ambiente estão descritas como fatores que determinam a fluidez e permeabilidade das membranas (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Os eosinófilos atuam nos processos de inflamação e na defesa celular mediante a degranulação, e se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastrointestinal, nas brânquias e na corrente sanguínea quando há infestação de parasitos (HINE, 1992). Estas células são arredondadas, normalmente com núcleo excêntrico e citoplasma com grânulos eosinofílicos (UEDA et al., 2001; RANZANI-PAIVA et al., 2003). Estão raramente presentes no sangue periférico de peixes, sendo observados com maior frequência em órgãos hematopoiéticos do que no sangue circulante, possivelmente são detectados na circulação somente quando necessários (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Já os

basófilos são raros na maioria dos peixes (HINE, 1992), são células esféricas, com citoplasma rico em grânulos basofílicos de vários tamanhos e apresentam núcleo esférico (UEDA et al., 2001).

Os eritrócitos de peixes são ovais, têm núcleo central acompanhando o formato da célula e seu citoplasma, relativamente abundante, apresenta-se acidófilo (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas no sangue, porém em muitas espécies é comum a presença de eritrócitos imaturos (reticulócitos e eritroblastos) no sangue periférico (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Tal fato deve ser interpretado com cuidado, uma vez que há um equilíbrio entre os tipos de células, sendo as células maduras mais numerosas. A quebra desse equilíbrio pelo excesso de células imaturas sugere a existência de alguma perturbação na sua maturação. Os eritrócitos tem a função de transportar O_2 e parte do CO_2 do sangue, através do pigmento respiratório, a hemoglobina, então, qualquer alteração ou falta destas células será traduzida como deficiência de O_2 nos tecidos (SADO, 2008).

Os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos modulam o sistema imune inato pela fagocitose e consequente, o extermínio do patógeno (VERLHAC; GABAUDAN, 1997). Durante a fagocitose, ocorre aumento do consumo do oxigênio molecular (“burst” oxidativo), que decorre da redução do oxigênio em ânion superóxido que, por meio da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este H_2O_2 sofre ação da enzima mieloperoxidase (MPO) liberada pelos leucócitos granulares, se transformando em hipoclorito e levando à produção de cloraminas. Todas estas espécies reativas de oxigênio (EROs) contribuem ativamente para sua destruição, pois são substâncias oxidantes que atuam sobre membranas de microrganismos (VERLHAC et al., 1998).

2.2 ACTIGEN®

O MOS é um prebiótico derivado da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, facilmente adicionado à dieta dos peixes. Segundo SPRING et al. (2000), para obtê-lo, a parede celular é separada do conteúdo intracelular e a solução contendo MOS é evaporado à baixa temperatura (*spray dry*)

para evitar a destruição da parte funcional da molécula. O MOS apresenta uma alta afinidade ligante, oferecendo um sítio de ligação competitivo para bactérias patogênicas Gram negativas, que apresentam fímbria tipo I específica, que são os elementos de aderência bacteriana. Essas bactérias ao se ligarem aos MOS não atuam sobre os sítios de ligação dos enterócitos, e consequentemente diminui a competição por nutrientes entre a microbiota intestinal e o hospedeiro (FERKET; PARKS; GRIMES, 2002), com isso há melhora da saúde intestinal, aumento da integridade das vilosidades intestinais e, consequentemente, um melhor aproveitamento dos nutrientes (LI et al., 2008).

O uso de MOS nos sistemas de produção de peixes e crustáceos tem promovido melhores índices de desempenho e meios de compensar os efeitos indesejáveis do estresse comuns na piscicultura (WELKER et al., 2007). Aumento no ganho de peso ou melhora nas respostas do sistema imunológico foram registrados em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (STAYKOV et al., 2007), carpa comum (STAYKOV; DENEV; SPRING, 2005), tilápia-do-Nilo (ÖZLÜER-HUNT et al., 2011), robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (TORRECILLAS et al., 2007), linguado (*Scophthalmus maximus*) (LI et al., 2008), bijupirá (*Rachycentron canadum*) (SALZE et al., 2008), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (GRISDALE-HELLAND et al., 2008), camarão tigre (*Penaeus semisulcatus*) (GENC et al., 2007), lagosta europeia (*Homarus gammarus*) (DANIELS et al., 2007) e juvenis de lagosta (*Panulirus homarus*) (HUU; JONES, 2014).

Juvenis de carpa comum alimentados com dietas com a adição de 0,6% de MOS na dieta durante 46 dias apresentaram um aumento do crescimento, maior absorção de proteínas e aumento na taxa de sobrevivência, quando comparadas ao grupo controle (CULJAK et al., 2004). O estudo com MOS em outras espécies de água doce, como juvenis de bagres europeus (*Silurus glanis*) têm mostrado melhora semelhante no crescimento e aumento do peso corporal, além de diminuição da mortalidade (BOGUT et al., 2006). Resultados positivos também foram obtidos em testes realizados com kinguio (*Carassius auratus gibelio*) alimentadas com MOS durante 10 semanas, no qual a ingestão de dietas suplementadas com 240 e 480 mg kg^{-1} MOS aumentaram a resistência contra infecções patogênicas, diminuindo a

mortalidade após desafio com *Aeromonas hydrophila* em relação ao grupo controle (LIU et al., 2013).

Actigen® (ACT, Alltech, Nickolasville, KY,USA) é um prebiótico contendo frações ativas de mananoproteínas (FAMP) e devido ao seu papel na imunomodulação melhora o desempenho produtivo e a saúde intestinal dos animais (HOOGE; CONNOLLY, 2011). O ACT foi desenvolvido usando tecnologias nutrigenômicas que permitem a detecção de alterações na expressão de genes em células intestinais, fornecendo proteção para o intestino por suas propriedades de ativação de mucina, indicando que animais suplementados com o ACT podem ter um aumento na produção de muco, proporcionando maior proteção do trato gastrointestinal (XIAO et al., 2011). Apresenta ainda capacidade de combater os organismos desfavoráveis do intestino, pois se liga aos sítios de ligação para os patógenos específicos do trato digestivo, evitando a colonização (XIAO et al., 2010; CHE et al., 2012). Além disso, mantêm a função digestiva e atividade enzimática, controla a inflamação e melhora o desempenho zootécnico (XIAO et al., 2010; CHE et al., 2012). O ACT é mais concentrado em atividade biológica do que o produto manana primeira geração (Bio-MOS®) (HOOGE; CONNOLLY, 2011; MALDARASANU et al., 2013), podendo ser incluídos em concentrações mais baixas do que o MOS, mostrando ainda melhorar o desempenho em condições desafiantes para o animal (SPRING et al., 2015).

Trabalhos utilizando ACT foram desenvolvidos com suínos (CHE et al., 2011; CORÇÃO et al., 2011); com frangos de corte (LEA et al., 2011; GERNAT, 2011; MUNYAKA et al., 2011) e codornas (MALDARASANU et al., 2013); obtendo-se melhora no desempenho produtivo, imunidade, integridade do intestino e redução de perdas.

Nos peixes, o número de estudos sobre os efeitos do ACT é extremamente limitado, existindo apenas estudos em espécies de peixes de água doce, como por exemplo, com o striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) (HUNG, 2012). Um grupo de peixes desta espécie foi suplementado durante 10 semanas com 0,12% ACT e apresentaram maiores crescimento, taxa de conversão alimentar, atividade de lisozima reforçada, níveis elevados de número de leucócitos e aumento da

sobrevivência quando desafiados contra *Edwarsiella ictaluri* ou elevados níveis de amônia (HUNG, 2012).

Outro estudo utilizando o ACT foi realizado, desta vez com o robalo europeu. Foram testadas duas concentrações: 0 (controle) e 0,16% ACT, e concluiu-se que a incorporação de 0,16% ACT na dieta promoveu maior taxa de crescimento específico e comprimento dos peixes, e o estímulo dos parâmetros do sistema imune associado ao intestino em relação ao controle (TORRECILLAS et al., 2015).

2.3 LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS)

A maioria das doenças bacterianas em peixes é causada por bactérias Gram negativas, que possuem lipopolissacarídeos (LPS) como componentes estruturais de sua parede (WRIGHT et al., 1990). O LPS é composto por um polissacarídeo e um núcleo, que por sua vez está ligado a um lipídio imerso na membrana externa das bactérias, chamado lipídio A. Embora o lipídio A seja responsável pela maioria dos efeitos de endotoxina nos animais ou em culturas de células, os outros componentes podem também contribuir com atividade biológica do LPS. Devido às variações na estrutura do LPS, a sua potência e a extensão da indução de choque; afinidade de ligação de proteínas e outras atividades biológicas variam de espécie para espécie (CUNNINGHAM et al., 1996).

O LPS estimula os macrófagos a sintetizar e liberar citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNFa), interleucina 1 (IL-1), 6 (IL-6), 8 (IL-8) e óxido nítrico (NO). Porém a liberação desordenada e excessiva dessas substâncias provoca a morte do hospedeiro como ocorre na endotoxemia e septicemia (WRIGHT et al., 1990).

As respostas produzidas pelo LPS em peixes são similares às observadas em mamíferos, porém quantitativamente seus efeitos nocivos são menos intensos, demonstrando a resistência relativa dos peixes ao LPS (CONGLETON; WAGNER, 1991). Isto pode estar relacionado com a menor quantidade de mediadores e proteínas de fase aguda que são liberados no processo inflamatório, como também a influência da temperatura que provoca modificações no tempo de aparecimento das respostas. Em peixes, esta cinética é mais demorada, com elevação dos níveis

circulantes de cortisol após 24 horas, de proliferação celular após três dias (WHITE et al., 1984), de proteínas de fase aguda em 48 horas, de hipoferremia após 72 horas sendo que a hiperglicemia ocorre por glicogenólise e não por gliconeogênese (CONGLETON; WAGNER, 1991).

A inoculação de LPS em peixes induz a produção de componente C3 do sistema de complemento e proteína C reativa, que é a primeira a aparecer no plasma da maioria dos animais que sofrem dano tecidual, infecção ou inflamação (YANO, 1996). Flores Quintana (2002) testou a aplicação em pacu de doses crescentes de LPS 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg kg^{-1} de PV e concluiu com análise citológica do exsudato, maior presença de células, sem causar a morte dos animais inoculados com 3,0 mg kg^{-1} de LPS.

O LPS pode ser também utilizado como fator de desafio para avaliar os efeitos de imunoestimulantes, uma vez que peixes alimentados com os imunoestimulantes podem apresentar um estado de alerta e expressar os componentes de defesa após estímulo adequado (SWAIN et al., 2008; NAYAK et al., 2008).

2.4 MODELO BIOLÓGICO

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi introduzida no Brasil em 1971, procedente da Costa do Marfim, África (CASTAGNOLLI, 1992), sendo cultivada na maioria dos estados brasileiros. É a espécie de peixe mais produzida em sistema intensivo, por se destacar pela sua rusticidade, crescimento rápido, boa conversão alimentar, adaptação ao confinamento, hábito alimentar onívoro, com grande aceitação de alimentos artificiais em todos os estágios de sua vida (SANTIAGO et al., 1987; HAYASHI, 1995; SCHWARZ et al., 2010). Além disso, é a espécie de peixe, entre as mais cultivadas, que melhor resiste à alta temperatura, a baixa concentração de oxigênio dissolvido e a alta concentração de amônia na água (POMPA; PHELPS, 1998). Apresenta carne com características sensoriais desejáveis e com boa aceitação no mercado consumidor, sendo a mais apropriada para a indústria de filetagem, e uma espécie de grande interesse para a piscicultura (HAYASHI et al., 2002; SCHWARZ et al., 2010).

Em 2011, a tilápia foi a espécie mais cultivada atingindo a produção de 253.824,10, representando 46,6% da produção total brasileira (MPA, 2014). Essa espécie apesar de não ser nativa do Brasil, foi a espécie mais cultivada, devido à maior disponibilidade de informações básicas e às suas características favoráveis para a produção. Apesar dessa maior disponibilidade de informações dessa espécie, ainda são faltam muitas informações, principalmente em relação às respostas imunológicas e hematológicas relacionadas com o imunoestimulante (Actigen®). Sendo assim, no presente trabalho foram avaliadas as respostas de fisiológicas, imunológicas e desempenho produtivo em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com diferentes concentrações de Actigen®, após desafio com LPS.

3 REFERÊNCIAS

ALCORN, S. W.; PASCHO, R. J.; MURRAY, A. L.; SHEARER, K. D. Effects of ration level on immune function in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Oxford, v. 217, p. 529-545, 2003.

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 281-307, 1992.

ANUALPEC. **Anuário estatístico da pecuária de corte.** São Paulo: FNP, 2014.

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000.

BARTON, B. A.; BOLLING, H.; HAUSKINS, B.; JANSEN, C. R. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns* x *S. platorynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126A, p. 125-134, 2000.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, p. 771-781, 1973.

BEAMAN, J. R.; GARDNER, H.; HOFFMAN, F.; ROSENCRANCE, A.; ZELIKOFF, J. T. Mammalian immunoassays for predicting the toxicity of malathion in a laboratory fish model. **Journal of Toxicology Environmental Health**, v. 56, p. 523-542, 1999.

BELETTI, M.E.; SILVA, M.; SANTOS, A.L.Q.; MANNA, F.D.; SOARES, J.M.; FERREIRA, C.A.Q. Ultrastructural study of thrombocytes of *Arapaima gigas*. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 14, n. 1, p. 3-10, 1998.

BENLI, A. C. K.; YILDIS, H. Y. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture research**, Oxford, v. 35, p. 1388-1390, 2004.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 86, n. 3, p. 76-87, 2014.

BLAZER, V. S. Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 77-86, 1991.

BOGUT, I.; MILAKOVIC, Z.; PAVLICEVIC, J.; PETROVIC, D. Effect of Bio-Mos on performance and health of European catfish, *Sillirus glanis*. In: ALLTECH'S 22ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 22., 2006. **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2006.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. V.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce.** Jaboticabal: Funep, 1992.

CEROZI, B. S. **Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

ÇETIN, N.; GÜÇLÜ, B. K.; ÇETIN, E. The effects of probiotic and mannanoligosaccharide on some haematological and immunological parameters in turkeys. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. A52, p.263-267, 2005.

CHAGAS, E. C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T. E. H. P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p.132-225.

CHE, T. M.; SONG, M.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W.; VAN ALSTINE, W. G.; DAWSON, K. A.; PETTINGREW, J. E. Effects of Actigen™ on peripheral blood immune cells in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). "Science and Technology in the Feed Industry". In: ALLTECH'S 27ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 27., 2011. **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2011.

CHE, T. M.; SONG, M.; LIU, Y.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W.; VAN ALSTINE, W. G.; DAWSON, K. A.; PETTIGREW, J. E. Mannan oligosaccharide increases serum concentrations of antibodies and inflammatory mediators in weanling pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2784–2793, 2012.

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

CORÇAO, A. A. P.; HANNAS, M. I.; VEIGA, A. A. Use of Actigen^{TM}- Performance, Salmonella control and antimicrobial revitalization. "Science and Technology in the Feed Industry". In: ALLTECH'S 27ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 27., 2011. **Proceedings…** Kentucky, KY, USA, 2011.

CULJAK, V.; BOGUT, I.; HAS-SCHÖN, E.; MILAKOVIC´, Z.; CANECKI, K. Influence of mananoligosaccharides supplementation on juvenile carp (*Cyprinus carpio*) in cage farming. **Krmiva,** v. 46, n. 1, p. 25-29, 2004.

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

DANIELS, C.; BOOTHROYD, D.; DAVIES, S.; PRYOR, R.; WELLS, C. Developing & understanding the use of pre-biotics in homarid lobster culture. **Aquaculture Health International**, Manukau, v. 8, p. 32-35, 2007.

DIONIZIO, M. A.; BERTECHINI, A. G.; KATO, R. K.; TEIXEIRA, A. S. Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte – desempenho e rendimento de carcaça. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, Edição Especial, p. 1580-1587, 2002.

DUGENCI, S. K.; ARDA, N.; CANDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 99–106, 2003.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 9, p. 291-308, 1999.

FANGE, R.; LUNDBLAD, G.; LIND, J. Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. **Marine Biology**, v. 36, p. 277-82, 1976.

FERKET, P. R.; PARKS, C. W.; GRIMES, J. L. Mannan oligosaccharides *versus* antibiotics for turkeys. In: ALLTECH´S EIGHTEENTH ANNUAL SYMPOSIUM, 2002. Nutritional biotechnology in the feed and food industry: **Proceedings…** Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 43-63.

FLEMMING, J. S. **Importância da utilização de leveduras (*S. Cerevisae*), e mos (mananoligossacarídeos) na alimentação animal.** 2005. 92 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

GALINDO-VILLEGA, J.; HOSOKAWA, H. Immunostimulants: Towards temporary prevention of disease in marine fish. In: CRUZ SUÁRES, L. E.; RICQUE MERIE, D.; NIETO LÓPEZ, M. G.; VILLAREAL, D.; SCHOLZ, U. E GONZÁLES, M. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 6., 2004, Sonora. Avances em nutrición acuícola: **Memorias…** Sonora, 2004, p. 13-23. 1 CD-ROM.

GATESOUPE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, Oxford, v. 180, p. 147-165, 1999.

GATLIN III, D. M.; LI, P.; WANG, X.; BURR, G. S.; CASTILLE, F.; LAWRENCE, A. L. Potential application of prebiotics in aquacuclture. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 8., 2006, Nuevo León. Avances em nutrición acuícola: **Memorias…** Nuevo León, 2006, p. 371-376. 1 CD-ROM.

GENC, M. A.; AKTAS, M.; GENC, E.; YILMAZ, E. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 13, p. 156-161, 2007.

GERNAT, A. Actigen and Zn bacitracin: Comparative effects on performance, intestinal Integrity and immunity of broilers. PanAmerican School of Agriculture/Zamorano, Teguci- galpa, Honduras. In: ALLTECH'S 27ND SCIENCE AND TECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY SYMPOSIUM, 27.; 2011 **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2011.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, B. M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n.6, p. 1401-1412, 1995.

GRINDE, B. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. **Journal of Fish Diseases**, v. 12, p. 95-104, 1989.

GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S. J.; GATLIN III, D. M. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharides, fructooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture,** Oxford, v. 283, p. 163-137, 2008.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias In: RIBEIRO, R. P.; HAYASHI, C.; FURUYA, W. M. (Eds.) **Curso de piscicultura-criação racional de tilápias**. Maringá: FADEC/UEM, p. 4, 1995.

HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M.; MEURER, F. Exigência de Proteína Digestível para Larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a Reversão Sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 823-828, 2002.

HINE, P.M. The granulocytes of fish. **Fish & Shellfish Immunology,** v.2, p.79-88, 1992.

HOOGE, D. M.; CONNOLLY, A. Meta-analysis summary of broiler chicken trials with dietary Actigen© (2009-2011). **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 10, p. 819-824, 2011.

HUNG, L. T. Building new aquafeeds: feeding for health and performance in Tra catfish (*Pangasiaodon hypophthalmus*). In: ALLTECH'S 28ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 28., 2012. **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2012.

HUU, H. D.; JONES, C. M. Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on juvenile spiny lobster *Panulirus homarus* (Palinuridae). **Aquaculture**, v. 432, n. 258-264, 2014.

JENEY, G.; ANDERSON, D. P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 116, p. 315-319, 1993.

JIAN, J.; WU, Z. Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, n. 185-91, 2004.

JOLLES, P.; JOLLES, J. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 63, n. 165-89, 1984.

LALL, S. P. Nutrition and health of fish. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA**,** 5., 2000, Mérida. Avances em nutrición acuícola: **Memórias…** Mérida, 2000, p. 13-23. 1 CD-ROM.

LANDOLT, M. L. The relationship between diet and the immune response of fish. **Aquaculture**, v. 79, p. 193-206, 1989.

LEA, H. K.; KAY, Z.; BURTON, E. J. Performance and gut health of poultry in the post-antibiotic era when feeding a novel yeast cell wall technology. In: WPSA UK BRANCH MEETING, 2011. **Meeting…** Jubilee Campus, Nottingham University, Nottingham, UK, 2011. p. 1.

LI, Y., WANG, Y. J.; WANG, L.; JIANG, K. Y. Influence of several non-nutrient additivies on nonspecific immunity and growth of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p. 387-395, 2008.

LIU, B.;XU, L.; GE, X.; XIE, J.; XU, P.; ZHOU, Q.; PAN, L.; ZHANG, Y. Y. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p.1395-403, 2013.

LYGREN, B.; SVEJER, H.; HJELTNES, B.; WAAGBO, R. Examination of the immunomodulatory properties and the effects on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-term period. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 95-107, 1999.

MACARI, M.; FURLAN, R. L. Probióticos. In: CONFERENCIA APINCO, 2005, Santos, **Anais**... Santos: FACTA, 2005. p. 53-68.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 137-151, 2006.

MAGNADÓTTIR, B.; AUDUNSDOTTIR, S. S.; BRAGASON, B. T. H.; GISLADOTTIR, B.; JONSSON, Z. O.; GUDMUNDSDOTTIR, S. The acute phase response of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Humoral and cellular responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1124-1130, 2011.

MĂLDĂRĂSANU, T. I.; SARA, A.; BENTEA, M.; MURESAN, C. The Influence of Some Prebiotics (Actigen, Bio-Mos) Administered in Laying Quails' feeds on Growth Performances and Egg Quality. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies,** v. 70, n. 2, p. 379-380, 2013.

MARTINS, M. L.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T.; FENERICK Jr, J.; RIBEIRO, K.; MIYAZAKI, D. M. Y.; CASTRO, M. P.; MALHEIROS, E. B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Orechromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004a.

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

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; NONAKA, M.; FUJITA, T. Complement-related serine proteases in tunicates and vertebrates. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 29-35, 1998.

MILES, R. D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract : Natural ways to prevent colonization by patogens. In : BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY ANNUAL SYMPOSIUM, 9., 1993. **Proceedings…** Nottingham University Press. London, 1993. p.133-150.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília: [s.n.], 2014.

MUNYAKA, P.; ECHEVERRY, H. M.; YITBAREK, A.; EINARSON, M.; SHARIF, S.; GUENTER, W.; HOUSE, J. D.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C. Toll-like receptors and cytokines profile of chickens supple- mented with yeast derivate carbohydrates. In: ALLTECH'S 27ND INTERNATIONAL ANIMAL HEALTH AND NUTRITION INDUSTRY SYMPOSIUM, 27., 2011. **Proceedings…** Lexington, KY, USA, Poster, 2011.

NAKAO, M.; YANO, T. Structural and functional identification of complement components of the bony fish carp (*Cyprinus carpio*). **Immunological Reviews**, v. 166, p. 27-38, 1998.

NAYAK, S. K.; SWAIN, P.; NANDA, P. K.; DASH, S.; SHUKLA, S.; MEHER, P. K.; MAITI, N. K. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, p. 394-9, 2008.
NEWMAN, K. Form follows function in picking MOS product. **Feedstuffs**, v. 79, p. 30-31, 2007.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v. 38, p. 1-2, 2002.

ORTUNO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESSEGUER, J. Effects of short-term crowding stress on gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) innate immune response. **Fish & Shellfish Immunology**; v. 11, n. 187-97, 2001.

ÖZLÜER-HUNT, A.; BERKÖZ, M.; ÖZKAN, F.; YALIN, S.; ERÇEN, Z.; ERDOĞAN, E.; GÜNDÜZ, S. G. Effect of mannan oligosaccharide on growth, body composition, and antioxidant enzyme activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 63, p. 619-628, 2011.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A. Prebióticos e probióticos na nutrição de aves. **Ciência Agrárias e da Saúde**, v. 2, n. 1, p. 59-64, 2002.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; FIGUEIREDO, D. F.; BOIAGO, M. M.; CARVALHO, S. R.; BORDON, V. F. **Revista Brasilaria de Cieneia Avicola**, v. 7, n. 4, 2005.

PENHA, M. L.; DIAS, J. L. C.; MALUCELLI, B. E. Influence of low envinmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science,** v.33, p.15-18, 1996.

POMPA, T. J.; PHELPS, R .P. Status report to commercial tilápia producers on monose x fingerling productions techniques. In: AQUICULTURA BRASIL'98, 1998, Recife. **Anais...** Recife: SIMBRAQ, p. 127-145, 1998.

RAA, J.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: FIRST SYMPOSIUM ON DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE (ed. by M. Shariff, R.P. Subasinghe & J.R. Arthur), 1., 1992. **Proceedings…** Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1992. p. 39–50.

RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. Avances em nutrición acuícola: **Memórias…** Mérida, 2000. p. 47-56. 1 CD-ROM.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELLA, M. C.; CELIBERTO, R. J. Hematologia da carpa *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus sp*. e após um tratamento com Fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2-tricloroetilo (Neguvon). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 14 (único), p. 83-92, 1987.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L.; VEIGA, M. L.; EIRAS, A. C.; CAMPOS, B. E. S. Differential leukocyte counts in “dourado”, *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu River, Pirassununga, SP. **Brazilian Journal of Biology**, v.63, n.3, p.517-525, 2003.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, E. A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. S.; LIZAMA, M. A. P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. cap. 4, p. 89-120.

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. 1. Ed. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. p. 48.

SADO, R. Y. **Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).** 2008. 136 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

SAKAI, D. K. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, p. 223-247, 1992.

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

SALZE, G.; MCLEAN, E.; SCHWARZ, M. H.; CRAIG, S. R. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. **Aquaculture**, v. 274, n. 148-52, 2008.

SANTIAGO, C. B.; ALDABA, M. B.; REYES, O. F. Influence of feedeing rate and diet form on growth and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquaculture,** v. 64, n. 2, p. 277-282, 1987.

SCHWARZ, K. K.; FURUYA, W. M.; NATALI, M. R. M.; MICHELATO, M.; GUALDEZI, M. C. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias-do-Nilo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences.** Maringá, v. 32, n. 2, p. 197-203, 2010.

SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. **Methods for fish biology**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. 632 p.

SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: cellular defenses. *In:* IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system.** London: Academic Press, 1996. p.95-103.

SERPUNIN, G. G.; LIKHATCHYOVA, O. A. Use of the ichthyohaematological studies in ecological monitoring of the reservoirs. **Acta Veterinária Brno**, Budapest, v. 67, p. 339-345, 1998.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.

SITJA-BOBADILLA, A.; PEREZ-SANCHEZ, J. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 637-640, 1999.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 71-90, 2003.

SOIVIO, A.; NIKINMAA, M. The swelling of erytrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. London: Academic Press, 1981. p. 197-221.

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

SPRING, P. Q.; WENKS, C.; CONNOLLY, A.; KIERS, A. A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 3, p. 1-11, 2015.

STAYKOV, Y.; DENEV, S.; SPRING, P. Influence of dietary mannan oligosaccharides (Bio-Mos®) on growth rate and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: HOWAL,B.; FLOS, R. (Ed.). **Lessons from the past to optimize the future.** Oostende, **European Aquaculture Society**, p. 431-432, 2005. (Special Publication, 35).

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 15, n. 2, p. 153-161, 2007.

STOSKOPF, M. Anaesthesia. In: Brown, L. (ed.). Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. **Pergamon Veterinary Handbook Series,** London, p. 161-168, 1993.

SUN, L. T.; CHEN, G. R.; CHANG, C. F. The physiological responses of tilapia exposed to low temperatures. **Journal of Thermal Biology**, **Exeter**, v. 17, p. 149-153, 1992.

SUNYER, J. O.; LAMBRIS, J. D. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 166, p. 39–57, 1998.

SWAIN, P.; NAYAK, S. K.; NANDA, P. K.; DASH, S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 191-201, 2008.

TAVARES, M. D.; CAMPOS, E.; SANDRIM, E. F. S. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 1, p. 175-184, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; SCHALCH, S. H. C.; ONAKA, E. M.; QUINTANA, C. I. F.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO4). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 574-554, 2002a.

TAVARES-DIAS, M.; RODRIGUES, C.A.P.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; SANTANA, A.E. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2002b.

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

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. S. Improved growth, immune stimulation and infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, 2006 (in press).

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

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; BENÍTEZ-SANTANA, T.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 674-81, 2011.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; DHANASIRI, A. K. S.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. **Journal of Fish Diseases**, v. 35, n. 591-602, 2012.

TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; CABALLERO, M. J.; ROBAINA, L.; MARIA JESÚS ZAMORANO, M. J.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. Effects of dietary concentrated mannan oligosaccharides supplementation on growth, gut mucosal immune system and liver lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42, n. 508-516, 2015.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of (Tilapia) *Oreochromis niloticus.* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Part II. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n. 6, 2001.

VAINIKKA, A.; JOKINEN, E.; KORTET, R.; PAUKKU, S.; PIRHONEN, J.; RANTALA, M. J.; TASKINEN, J. Effects of testosterone and b-glucan on immune fuctions in tench. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 348-361, 2005.

VENDEMIATTI, J. A.; COSTA, A. B.; CYRINO, J. E. P. Mananoligossacarídeos alimentares (MOS) como agentes profiláticos das infecções por *Edwardsiella tarda* em tilápia-do-Nilo. In: CONGRESO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2003, Zaragoza. **Anales…** Zaragoza: Universidad de Zaragoza, 2003. p. 123-140.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J., The effect of vitamin C on Fish Health. **Roche Technical Buletin**, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, 30 pp., 1997.

VERLHAC, V.; OBACH, J.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.8, p.409-424, 1998.

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

WANG, W. S.; WANG, D. H. Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* infections by several polysaccharides. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 20, n. 261-70, 1997.

WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole cell yeast or yeast subcomponents. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 1, p. 24-35, 2007.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WHITE, A.; Mc.ARTHUR, J.; FLETCHER, T. Distribution of endotoxin and its effect on serum concentration of C reactive protein and cortisol in the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 79C, p. 97-101, 1984.

WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish disease and Disorders**, v. 3, p. 626 – 633, 1998.

WRIGHT, S.; RAMOS, R.; TOBIAS, P.; ULEVITCH, R.; MATHINSON, A. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science.**, v. 249, p. 1431-1433, 1990.

XIAO, R.; POWER, R. F.; MALLONEE, D.; CROWDUS, C.; AO, T.; PIERCE, J. L.; DAWSON, K. A. Transcriptional signatures associated with biological functions of Bio-Mos® and Actigen® in broilers. In: IPSF ATLANTA, 2010. **Proceedings...** Atlanta, GA, USA, 2010. p. 76.

XIAO, R.; POWER, R. F.; MALLONEE, D.; SPANGLER, L.; ROUTT, K.; BRENNAN, K. M.; PIERCE, J. L.; DAWSON, K. A. Gene expression study reveals the association of dietary supplementation of Actigen and the regulation of pathogen-influenced signaling pathways in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, p. 142-142, 2011.

YANO, T. The nonspecific immune system humoral defense. In: **The fish immune system.** Iwama and Nakanishi Editor. Academic Press, London, 1996. p. 106-140.

YOUSIF, A. N.; ALBRIGHT, L. J.; EVELYN, T. P. T. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 19, n. 15-9, 1994.

ZELIKOFF, J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non – mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, v. 129, n. 1, p. 63–71, 1998.

ZELIKOFF, J. T.; RAYMOND, A.; CARLSON, E.; LI, Y.; BEAMAN, J. R.; ANDERSON, M. Biomarkers of immunotoxicity in fish: from lab to ocean. **Toxicology Letters**, v. 112-113, p. 325-331, 2000.

CAPÍTULO 2 - IMUNOMODULAÇÃO POR ACTIGEN® EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO PRODUTIVO APÓS DESAFIO COM LPS

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição das diferentes concentrações de ACT na dieta sobre as respostas imunológicas e fisiológicas e de desempenho zootécnico da tilápia após desafio com o lipopolissacarídeo (LPS). O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Unesp, Campus de Dracena, onde foram utilizados 288 juvenis de tilápias (12 animais/caixa) e foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (0%; 0,04%; 0,06% e 0,08% de ACT) e 6 repetições. Foram realizados dois experimento, sendo que no primeiro foram realizadas duas biometrias aos 30 e 60 dias de experimento, com coletas de amostras de sangue de dois peixes por caixa em cada período. O segundo experimento foi realizado após os 60 dias, no qual os peixes foram desafiados com injeção intraperitoneal com LPS e após 5 e 12 dias da inoculação, foram coletadas amostras sanguíneas de dois peixes por caixa. Foram avaliados o desempenho zootécnico, parâmetros imunológicos, hematológicos e bioquímicos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). O desempenho zootécnico tanto aos 30 como aos 60 dias não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos. No primeiro experimento, independente do período de administração do ACT, a adição de 0,06 e 0,08% ACT na dieta promoveu maior atividade respiratória em relação às demais concentrações. No segundo experimento, o LPS usado como fator de desafio mostrou-se eficiente, pois independente das concentrações de ACT, as médias da atividade respiratória de leucócitos foram maiores aos 5 dias da inoculação. Isto indica que o LPS estimula a fagocitose e a produção de EROs precocemente, consequentemente, pode ser considerado um componente para desafio, pois aumenta os componentes inatos de defesa. As respostas de globulina foram influenciadas pela interação do tempo x concentração aos 5 e 12 dias após o desafio, sendo que aos 12 dias os valores de globulina foram maiores ($P < 0,05$) em relação aos demais períodos e na concentração de 0,06% ACT os resultados foram mais elevados também. O uso de frações ativas de mananoproteínas apresentou alguns efeitos positivos sobre os parâmetros imunes, indicando uma possível ação benéfica a fim de melhorar o desempenho e estado de saúde em peixes, entretanto alguns resultados foram contraditórios, e ainda precisam de mais estudos para um melhor entendimento sobre seus efeitos nos mecanismos de defesa e desempenho.

Palavras-chave: Frações ativas de mananoproteínas, imunodulador, prebiótico, peixe, endotoxina

CHAPTER 2 - IMMUNOMODULATION BY ACTIGEN® IN TILAPIA (O*reochromis niloticus*): PHYSIOLOGICAL RESPOSNSE AND PRODUCTIVE PERFORMANCE AFTER LPS CHALLENGE

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the effects of adding the different ACT concentrations in the diet on the immunological and physiological responses and growth performance of tilapia after challenge with lipopolysaccharide (LPS). The experiment was conducted in the Aquaculture Laboratory of UNESP, Campus de Dracena, where they were used 288 juvenile tilapia (12 animals/cage) and was conducted in a completely randomized design with 4 treatments (0%, 0.04%, 0.06% and 0.08% ACT) and 6 replications. Two experiments were conducted, in the first were two biometrics at 30 and 60 days of experiment, with collections of two fish blood samples per box in each period. The second experiment was carried out after 60 days, in which the fish were challenged by intraperitoneal injection with LPS and after 5 and 12 days after inoculation, blood samples were collected from two fish per box. The growth performance, immunological, hematological and biochemical parameters were measured. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and means compared by Tukey test (5%). The growth performance both at 30 and at 60 days showed no significant differences ($P>0.05$) between treatments. In the first experiment, regardless of the ACT administration period, the addition of 0.06 and 0.08% in the ACT diet promoted higher respiration compared to other concentrations. In the second experiment, LPS used as challenge factor was efficient, because independent of the ACT concentrations, the means of the respiratory activity of leukocytes were higher at 5 days after inoculation. This indicates that LPS stimulates phagocytosis and the production of EROs early hence a challenge component can be considered as it enhances innate defense components. The globulin answers were influenced by the interaction time x concentration at 5 and 12 days after challenge, and at 12 days the globulin values were higher ($P<0.05$) compared to other periods and at levels of 0.06% ACT results were higher too. Using The active fractions of mannan rich proteins showed some positive effects on the immune parameters, indicating a possible beneficial action in order to improve performance and health in fish, though some results have been contradictory, and still need more studies to a better understanding of its effects in defense and performance mechanisms.

Keywords: Active fractions of mannan rich proteins, immunomodulation, prebiotic, fish, endotoxin

1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta excelente potencial zootécnico e reprodutivo, caracterizando-se como um dos peixes mais produzidos no Brasil e no mundo (YASSUI et al., 2007), A intensificação dos sistemas de produção deste peixe, tem gerado inúmeros fatores estressores e assim aumentando a preocupação com a saúde, pois as doenças são responsáveis por grandes perdas na aquicultura mundial. Esses fatores estressantes resultam na imunossupressão, facilitando o aparecimento de infecções parasitárias e bacterianas. A maioria das doenças bacterianas em peixes é causada por bactérias Gram negativas, que possuem lipopolissacarídeos (LPS) como componentes estruturais de sua parede (WRIGHT et al., 1990).

Como consequência, a utilização de imunoestimulantes tem sido uma boa alternativa para melhorar as respostas do sistema imune, como é o caso do mananoligossacarídeo, prebiótico extraído da parede de celular da levedura *Saccharomyces cerevisae (*DIMITROGLOU et al., 2011; TORRECILLAS et al., 2014). Contudo, o uso deste imunoestimulante requer o conhecimento das doses ideais a serem usadas para cada espécie de peixe, tempo de suplementação e condições de produção (TORRECILLAS et al., 2014).

Actigen® (ACT, Alltech, Nickolasville, KY, USA) é um prebiótico contendo frações ativas de mananoproteínas (FAMP). É a segunda geração de MOS, desenvolvida usando tecnologias nutrigenômicas, e devido ao seu papel na imunomodulação melhora o desempenho produtivo e a saúde intestinal (HOOGE; CONNOLLY, 2011), sendo mais concentrado em atividade biológica do que o produto manana de primeira geração (Bio-MOS®) (HOOGE; CONNOLLY, 2011; MALDARASANU, 2013).

O número de estudos sobre os efeitos do ACT em peixes é limitado (HUNG, 2012). Mas, com base nas evidências dos resultados positivos em relação ao desempenho zootécnico e imunidade, obtidos com o produto primeira geração (Bio-MOS®), o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas e imunológicas e o desempenho produtivo, em tilápias do Nilo, alimentadas com diferentes concentrações de Actigen®, após desafio com LPS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 INSTALAÇÕES E QUALIDADE DA ÁGUA

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Dracena. Foram utilizados 24 caixas de polietileno com capacidade para 130 L, dispostas em sistemas de circulação aberta, com renovação contínua de água proveniente de poço artesiano, com aeração forçada através de sopradores de ar e pedras porosas. A temperatura foi mantida constante (aproximadamente 26°C) por de aquecedores com termostatos e o fotoperíodo natural (12L:12E).

A matéria orgânica depositada no fundo das caixas, durante todo o experimento e sempre que necessário, foi removida através de sifonamento com uma mangueira de borracha. A vazão da água nas caixas foi de 2 a 2,5 L por minuto, em média e os parâmetros limnológicos das caixas como a concentração de oxigênio dissolvido (5,8 ± 1,4 mg dL^{-1}) (CONAMA, 2005), temperatura (26 ± 1,4 °C) (LIM; WEBSTER, 2006) e potencial hidrogeniônico (7,7 ± 0,6) (SIPAÚBA-TAVARES, 1995; CONAMA, 2005) foram monitorados diariamente por meio de medidores portáteis e permaneceram dentro dos valores considerados ideais para a espécie.

2.2 DIETAS EXPERIMENTAIS

O imunoestimulante Actigen® (ACT) foi adicionado nas concentrações de 0%; 0,04%; 0,06% e 0,08% em uma dieta prática, formulada para atender as exigências nutricionais da espécie (FURUYA, 2010), conforme Tabela 1. Os ingredientes foram triturados em moinho de martelo (peneira de 0,8 mm), misturados, peletizados com adição de água (30%) e levados à estufa a 45°C por 48 horas. As dietas foram armazenadas em potes plásticos e conservadas sob refrigeração (4°C) durante todo o experimento.

Tabela 1. Composição Nutricional e centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes	**Dietas**			
	Controle	**0,04%**	**0,06%**	**0,08%**
Farelo de soja	37,00	37,00	37,00	37,00
Milho	26,70	26,70	26,70	26,70
Farelo de trigo	22,58	22,54	22,52	22,50
Farinha de peixe	8,00	8,00	8,00	8,00
Fosfato Bicálcico	2,30	2,30	2,30	2,30
Óleo de soja	1,00	1,00	1,00	1,00
Premix[1]	1,40	1,40	1,40	1,40
Cloreto de sódio	1,00	1,00	1,00	1,00
Vit. C	0,02	0,02	0,02	0,02
Actigen[2]	0,00	0,04	0,06	0,08
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição Nutricional Calculada				
MS %	88,87	88,84	88,82	88,80
PB %	26,83	26,83	26,82	26,82
PD[3] %	24,14	24,13	24,13	24,13
EE %	3,95	3,95	3,95	3,95
FB %	5,44	5,44	5,44	5,44
MM %	8,89	8,88	8,88	8,88
ENN %	43,53	43,51	43,50	43,49
EB kcal/kg	3.914	3.913	3.912	3.911
ED kcal/kg	2.973	2.972	2.971	2.970

[1]enriquecimento por quilograma de ração: Vit.-A 3.000 UI; Vit.-D3 3.000 UI; Vit. E-200,00 mg; Vit. B1-6,00 mg; Vit. B2-8,00 mg; Vit. B6-3,00 mg; Vit. B12-20,00 mg; Vit. C-350,00 mg; Vit. K-6,00 mg; Ac. Fólico-1,00 mg; Ac. Pantotênico-20,00 mg; Biotina-0,10 mg; Cobre-10,00 mg; Ferro-100,00 mg; Iodo-5,00 mg; Manganês-70,00 mg; Niacina-100,00 mg; Zinco-150,00 mg; B.H.T.-125,00 mg; Colina-150,00 mg.
[2]Actigen®, (ACT) Alltech, Nickolasville, KY,USA.

2.3 EXPERIMENTO 1

2.3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O primeiro experimento foi realizado para avaliar o período e as concentrações de administração do ACT e determinar os efeitos do imunoestimulante no sistema imune não específico, parâmetros hematológicos e bioquímicos de juvenis de tilápias-do-Nilo.

Foram utilizados 288 juvenis de tilápia com peso médio inicial e comprimento total inicial de 38,4±0,26 g e 12,73±0,89 cm, respectivamente (média ± desvio

padrão), para realização do experimento, provenientes de piscicultura comercial. Os peixes foram aclimatados às condições laboratoriais por 30 dias em caixas de polietileno e alimentados quatro vezes ao dia com ração controle (0% ACT) até saciedade aparente. Entende-se por saciedade aparente o momento em que os animais deixam de consumir os peletes de ração, desta forma as rações foram fornecidas em pequenas porções durante alguns minutos, com cautela e observação do comportamento animal, para desta forma não haver sobra de rações. O consumo de ração foi medido diariamente por meio de pesagem dos recipientes de armazenagem de rações de cada caixa.

Após o período de aclimatação, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, anestesiados em solução de óleo de cravo (1 g 10 L^{-1} de água), individualmente pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01 g, medidos em ictiômetro e distribuídos em 24 caixas de polietileno, com densidade de 12 animais por caixa. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 30 e 60 dias até a saciedade aparente, em 4 refeições diárias (09h00m, 12h00m, 15h00m e 18h00m).

2.3.2 ANÁLISES IMUNOLÓGICAS, HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Aos 30, 60 dias de experimento foram retirados dois animais de cada caixa, que foram submetidos à colheita de sangue por meio de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 5 mL. Foram utilizadas seringas sem anticoagulante para a obtenção de soro, que foi destinado para determinação da concentração de lisozima, atividade hemolítica do complemento, proteína total e albumina. Para a obtenção do sangue total, microtubos com anticoagulante (heparina) foram utilizados para armazenamento do sangue destinado à determinação da atividade respiratória de leucócitos, hemograma completo com determinação do hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e índices hematimétricos, contagem total e diferencial de leucócitos. O sangue colhido nas quatro amostragens foi processado e armazenado em nitrogênio líquido para amostras destinadas a análise de atividade hemolítica do complemento e em freezer (-10°C) para o restante das análises.

Parâmetros imunológicos

Atividade de lisozima

A determinação da atividade da lisozima foi realizada segundo o método clássico de lisar uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus,* por ensaio turbidimétrico e medida pela redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (SMOLELIS; HARTSELL, 1949), modificado (BILLER-TAKAHASHI et al., 2014). A atividade da lisozima foi realizada em microplacas de 96 cavidades de acrílico estéril, na qual 10 µL de soro (em triplicata) foram homogenizados com 10 µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2). Após homogenização, o soro foi submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2, mantendo um volume final de 50 µL por cavidade. Foram adicionados em cada cavidade 125 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2% em tampão fosfato de sódio). A redução da densidade óptica, em 450 nm, foi avaliada entre 0 e 20 min a 30ºC em espectrofotômetro tipo ELISA. Os resultados em unidade de atividade (U mL^{-1}) foram determinadas como a quantidade de enzima que produziu, em 450 nm, uma Δ DO de 0,001/min (WON et al., 2004).

Atividade hemolítica do complemento – Via alternativa

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada de acordo com metodologia descrita previamente por Biller et al. (2012). Uma alíquota de sangue total de coelhos foi misturada a um mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante filtrada em gaze estéril para retirada de material suspenso. Foi adicionada à solução filtrada o mesmo volume do agente quelante TEA-EDTA (trietanolamina - ácido etileno diaminotetracético) 10 nM, pH 7,4 e gelatina a 0,1%, e esta solução incubada por 15 min, a 37°C, e centrifugada a 2500 rpm, por 10 min, a 4°C, para separação dos eritrócitos. Os eritrócitos, então, ressuspensos em tampão TEA – Mg^{2+} 2 mM, pH 7,4 foram lavados com o mesmo tampão por três vezes após centrifugação (2500 rpm, por 10 min, a 4°C). Os eritrócitos, depois da última centrifugação, foram ressuspensos em solução de Alséver e armazenados a -10°C, sendo viáveis por até 15 dias. No momento da

utilização, parte da suspensão de eritrócitos armazenada foi lavada duas vezes com tampão TEA-EGTA (trietanolamina - ácido etileno glicoltetracético) 8 mM e Mg^{2+} 2 mM, com gelatina 0,1% (2500 rpm, por 10 min, a 4° C) e ressuspensos em tampão TEA-EGTA 1%, em densidade óptica entre 0,8 e 0,9, a 700 nm. Foi realizada a análise da atividade hemolítica do complemento pela mistura de 200 µL de cada diluição de soro com 400µl da suspensão de eritrócitos, a qual foi submetida à leitura da absorvância em comprimento de onda de 700 nm, por 10 min, em espectrofotômetro cinético provido de banho a 37° C. Após a padronização da diluição do soro a ser utilizada, 60µl de soro de peixes de todos os tratamentos, na diluição de 1:10, foram adicionados a 140 µL de tampão TEA-EGTA 8 mM e Mg^{2+} 2 mM, com gelatina 0,1%, e a essa mistura acrescentados 400 µL da suspensão de eritrócitos. A solução foi, então, submetida à leitura em espectrofotômetro tipo ELISA, como descrito.

Atividade respiratória de leucócitos

Para análise da atividade respiratória de leucócitos foi seguido o protocolo de Biller-Takahashi et al. (2013). O método consistiu na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo "burst" oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante "*nitroblue tetrazolium*" (NBT) que formam precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min. a 25°C. Após incubação 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de *formazan* liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

Parâmetros hematológicos

A partir das amostras sanguíneas heparinizadas, procedeu-se a determinação do hematócrito pela técnica do microhematócrito, dosagem da taxa de hemoglobina (Kit Labtest) e contagem total de eritrócitos. A partir dos dados obtidos, foram calculados os índices hematimétricos, compreendidos pelo volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM). Extensões sanguíneas foram confeccionadas e utilizadas na contagem total e diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, célula granulocítica especial (CGE) ou leucócito granular PAS (LG-PAS) e basófilo).

Valor do hematócrito

Amostras sanguíneas homogeneizadas foram introduzidas em capilares para microhematócrito e uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 g em centrífuga de microhematócrito e a avaliação foi feita com o auxílio da tabela de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971).

Concentração de hemoglobina

Foi utilizado o método da cianometa-hemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973): 0,01mL (10µL) de sangue foram diluídos em 2,5 mL do reagente de cor da hemoglobina; após 10 minutos (completa conversão da hemoglobina em cianometahemoglobina) a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, o sobrenadante recolhido para leitura da absorvância em espectrofotômetro, no comprimento de onda 540 nm e os resultados expressos em g 100 mL^{-1}.

Contagem total de eritrócitos

Para a contagem do número de eritrócitos, alíquotas de sangue de cada animal foram diluídas 1:200 em solução de formol-citrato 4% (NATT; HERRICK, 1952). Após a homogeneização da solução a contagem foi realizada em câmara de Newbauer.

Contagem total e diferencial das células de defesa

Extensões sanguíneas de cada animal foram feitas em lâminas de vidro com extremidade fosca e foram deixadas para secar ao ar e submetidas à coloração de pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. A contagem total dos leucócitos e trombócitos foram realizadas por método indireto, pela quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas obtido no contador de células. Já o diferencial de leucócitos foi quantificado contando-se 200 células e estimando para o total de leucócitos.

$$\text{Leucócitos (por µL)} = \frac{n^{\circ}\text{leucócitos} \times n^{\circ}\text{total de eritrócitos (por µL)}}{2000\ \text{eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

$$\text{Trombócitos (por µL)} = \frac{n^{\circ}\text{trombócitos} \times n^{\circ}\text{total de eritrócitos (por µL)}}{2000\ \text{erirócitos contados na extensão sanguínea}}$$

Índices hematimétricos

O cálculo do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram realizados segundo WINTROBE (1934):

$$VCM\ (\mu^3) = \frac{Hemat\ \ crito \times 10}{n^{\circ}\text{total de eritrócitos}}$$

$$\text{HCM}(\text{pg cel}^{-1}) = \frac{\text{Hemoglobina } \times 10}{n^{\circ}\text{total de eritrócitos}}$$

$$\text{CHCM}(\text{g dL}^{-1}) = \frac{\text{Concentração de Hemoglobina } \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

Parâmetros bioquímicos

Concentração sérica de proteína total, albumina, globulina e índice A:G

A concentração de proteína total foi determinada no soro pelo método do biureto e a de albumina pelo método colorimétrico – verde de bromocresol (Kit Labtest). A globulina foi determinada subtraindo a albumina da proteína total e o índice albumina-globulina (A:G) foi calculado dividindo-se o valor da fração albumina pelo valor total da fração globulina de cada amostra analisada.

2.3.3 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Foram realizadas amostragem aos 30 e 60 dias de experimento. Os peixes foram submetidos a 24 horas de jejum, anestesiados em solução de óleo de cravo (1g $10L^{-1}$ de água), individualmente pesados e medidos. Foram calculados e avaliados os seguintes parâmetros de desempenho, segundo Tacon (1990):

- Peso médio final (PF);
- Ganho em peso:

$$\text{GP (g)} = (\text{peso médio final} - \text{peso médio inicial});$$

- Ganho em peso diário:

$$\text{GPD (g dia}^{-1}) = \frac{(\text{peso médio final} - \text{peso médio inicial})}{\text{período experimental}}$$

- Taxa de crescimento específico:

$$\text{TCE (\% dia}^{-1}) = \left(\frac{\ln \text{peso final} - \ln \text{peso inicial}}{\text{período experimental}}\right) \times 100$$

- Consumo de alimento (g);

- Consumo alimentar diário:

$$\text{CAD (g dia}^{-1}) = \frac{\text{alimento consumido}}{\text{período experimental}}$$

- Conversão alimentar aparente:

$$\text{CA} = \frac{\text{alimento fornecido}}{\text{ganho em peso total}}$$

- Mortalidade.

2.4 EXPERIMENTO 2

O segundo experimento foi conduzido para avaliar os efeitos do desafio por lipopolissacarídeo nas respostas imunes específicas e não específicas, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de tilápias após o período experimental de 60 dias.

2.4.1 DESAFIO POR LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS)

Após 60 dias de suplementação de prebiótico nas dietas, os animais foram anestesiados com óleo de cravo (1g 10^{-1} L de água) e desafiados por meio de injeção intraperitoneal de 0,1 mL da endotoxina LPS por grama de peixe (500 µg kg^{-1}, extraída de *E. coli* 026:B6, Sigma, St. Louis, MO, USA). Neste período de desafio os animais deixaram de receber as dietas com o Actigen®. Aos 5 e 12 dias após o desafio foi colhido sangue para posteriores análises e foram observadas a taxa de mortalidade diariamente durante todo o período (SELVARAJ et al., 2006).

2.4.2 ANÁLISES IMUNOLÓGICAS, HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Após 5 e 12 dias do desafio foram retirados dois animais de cada caixa, que foram submetidos à colheita sanguínea por meio de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 5 mL. Foram utilizadas seringas sem anticoagulante para o sangue destinado à obtenção de soro, utilizado na determinação da concentração de lisozima, atividade hemolítica do complemento,

proteína total e albumina. Para a obtenção de sangue total, microtubos com anticoagulante (heparina) foram utilizados para armazenamento de sangue destinado à determinação da atividade respiratória de leucócitos, hemograma completo com determinação do hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e índices hematimétricos, contagem total e diferencial de leucócitos como descrito no experimento 1. O sangue colhido nas amostragens foi processado e armazenado em nitrogênio líquido para amostras destinadas a análise de atividade hemolítica do complemento e em freezer (-10°C) para o restante das análises.

2.5 DELINEAMENTO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 6 repetições, sendo os tratamentos correspondendo as concentrações de 0%; 0,04%; 0,06% e 0,08% de ACT nas dietas. Os dados foram submetidos ao Teste de Cramer-von Mises para verificar a normalidade e ao Teste de Brown Forsythe para verificar a homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, por meio do programa estatístico SAS, versão 9.0.

3. RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTO 1

3.1.1 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

A atividade respiratória dos leucócitos não foi influenciada ($P > 0,05$) pela inclusão do imunoestimulante aos 30 e 60 dias de experimento (Figura 1). Porém, percebem-se diferenças ($P < 0,05$) nas médias das concentrações aos 30 e 60 dias de experimento, sendo que aos 30 dias (0,3±0,06 DO) foi observada maior produção de espécies reativas de oxigênio em relação aos 60 dias (0,25±0,04 DO). Já para as médias de cada concentração, independente do tempo de coleta, as concentrações de 0,06% e 0,08% foram maiores que o controle ($P < 0,05$) (Tabela 2).

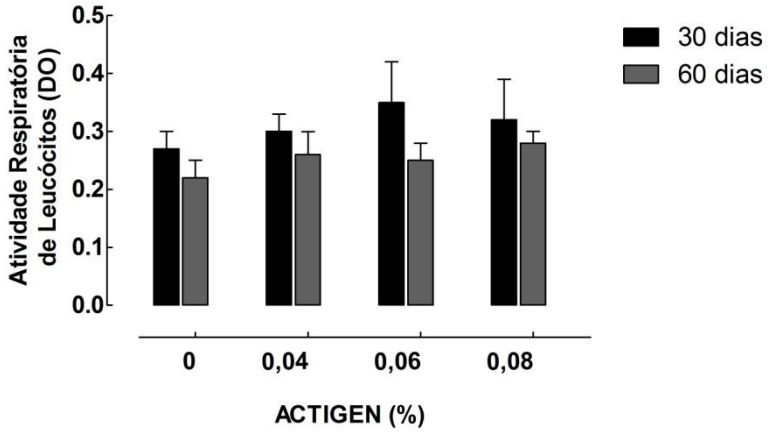
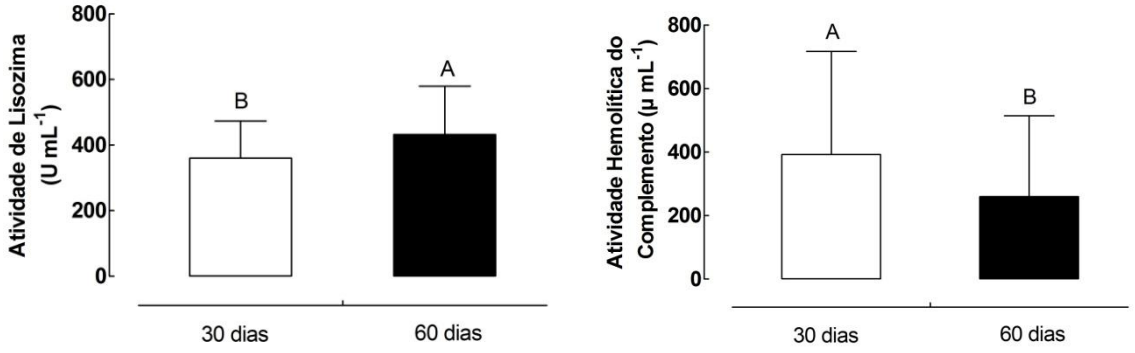


Figura 1. Média dos valores de atividade respiratória de leucócitos do sangue de tilápias (média ± desvio padrão) alimentadas com Actigen® (ACT) aos 30 e 60 dias de experimento.

Os resultados da atividade da lisozima diferiram (P < 0,05) (Figura 2) nas médias das concentrações entre os tempos de coleta, sendo que aos 60 dias os resultados foram maiores que aos 30 dias. No complemento (Figura 3) ocorreu o inverso, aos 30 dias de experimento os valores foram maiores (P < 0,05) que aos 60 dias.



Figuras 2 e 3. Média dos valores de atividade da lisozima e atividade hemolítica do complemento do sangue de tilápias (média ± desvio padrão) alimentadas com Actigen® (ACT) aos 30 e 60 dias de experimento. Médias seguidas de letras diferentes nas barras diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

A globulina e o índice A:G se comportaram da mesma maneira, sendo a média das concentrações entre as amostragens aos 60 dias maior (P < 0,05) em relação aos 30 dias de experimento. Já para albumina e proteína não houve diferenças (P > 0,05) (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros imunológicos e bioquímicos de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de Actigen® avaliados aos 30 e 60 dias de experimento.

	Dias experimentais	Actigen (%)				
		0 (Controle)	0,04	0,06	0,08	Médias
Burst (DO)	**30d**	0,27±0,03	0,3±0,03	0,35±0,07	0,32±0,07	0,3±0,06A
	60d	0,22±0,03	0,26±0,04	0,25±0,03	0,28±0,02	0,25±0,04B
	Médias	0,24±0,04b	0,28±0,04ab	0,3±0,08a	0,3±0,05a	
Lisozima (U mL^{-1})	**30d**	318,8±67,4	390,7±107,4	364,2±136,6	367,5±130,7	360,3±113,2B
	60d	404,9±95,8	378,6±175,3	510,7±164,1	419,7±114,3	432,4±146,9A
	Médias	357,9±90,8	385,2±138,8	437,4±165,6	391,2±123,5	
Complementot	**30d**	313,2±145,8	484,0±339,6	472,0±497,2	283,1±168,1	392±325,2A
	60d	245±117,6	337,7±224,6	247,3±126,8	203,7±103,4	259,9±154,2B
	Médias	274,8±130,8	410,9±290,1	348,4±354,5	245,5±143,3	
Albumina (g dL^{-1})	**30d**	1,2±0,18	1,1±0,4	1,23±0,31	1,3±0,31	1,19±0,3
	60d	1,5±0,82	1,97±1,9	1,24±0,49	1,34±0,47	1,49±0,99
	Médias	1,3±0,6	1,5±1,3	1,23±0,4	1,32±0,4	
Proteína (g dL^{-1})	**30d**	3,17±0,5	2,92±0,87	3,33±0,96	3,67±0,88	3,29±0,8
	60d	4,6±1,2	4,28±0,7	4,03±0,82	4,59±0,92	4,4±0,97
	Médias	3,9±1,2	3,6±1,0	3,65±0,9	4,15±0,97	
Globulina (g dL^{-1})	**30d**	2,0±0,4	1,7±0,7	2,1±0,7	2,37±0,55	2,07±0,6B
	60d	3,1±0,5	3,1±0,5	3,0±0,8	3,25±0,9	3,13±0,7A
	Médias	2,6±0,7	2,3±0,9	2,5±0,9	2,82±0,9	
Índice A:G	**30d**	0,6±0,2	0,8±0,3	0,7±0,3	0,56±0,1	0,64±0,2B
	60d	2,4±0,6	2,4±0,6	2,5±0,9	2,62±0,91	2,48±0,7A
	Médias	1,5±0,99	1,5±0,97	1,39±1,09	1,63±1,24	

Valores são médias ± DP(n = 6 caixas/tratamento). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre pelo teste de Tukey (P < 0,05). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre pelo teste de Tukey (P < 0,05).

3.1.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A análise de variância para os parâmetros hematológicos em relação aos tratamentos, tempos de coleta e a interação de ambos está representada na Tabela 3.

A suplementação das tilápias com o ACT influenciou significantemente nas médias das concentrações de hemoglobina (HGB), número total de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), sendo maiores (P < 0,05) aos 30 dias que aos 60 dias. Já para o hematócrito (HCT) e o volume corpuscular médio (VCM) ocorreu o inverso, com médias maiores aos 60 dias.

A HGB e RBC foram maiores (P < 0,05) nas médias das concentrações (independente do tempo) de 0,08% ACT em relação ao controle (0%), não direrindo (P > 0,05) entre os outros tratamentos. O VCM diferiu (P < 0,05) na média de concentração de 0,06% ACT em relação aos demais tratamentos.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de Actigen® avaliados aos 30 e 60 dias de experimento.

	Dias Experimentais	Actigen (%)				
		0 (Controle)	**0,04**	**0,06**	**0,08**	Médias
HGB ($g\ dL^{-1}$)	**30d**	7,8±1,2	10,1±1,7	9,8±1,8	11,1±1,3	9,7±1,9A
	60d	6,1±2	6,7±2,2	8,3±2,9	8,4±1,9	7,4±2,4B
	Médias	6,9±1,8b	8,3±2,6ab	9,0±2,5a	9,7±2,1a	
HTC (%)	**30d**	31,9±4,6	33,4±2,3	36,2±2,5	36,2±2,5	34,4±3,5B
	60d	46,8±8,4	40,7±7,4	43,6±9,5	41,1±5,9	42,9±7,8A
	Médias	38,5±9,9	36,7±6,3	39,5±7,4	38,8±5,2	
RBC ($x10^6\ mm^{-3}$)	**30d**	2,3±0,4	2,7±0,6	2,5±0,4	2,8±0,5	2,6±0,5A
	60d	2,1±0,3	2,3±0,3	2,3±0,1	2,4±0,3	2,3±0,3B
	Médias	2,2±0,4b	2,5±0,5ab	2,4±0,3ab	2,6±0,5a	
CHCM ($g\ dL^{-1}$)	**30d**	24,8±4,5	29,1±6,4	27,4±5,6	31,8±4,9	28,6±5,8A
	60d	13,7±2,9	17,6±6,2	19,9±9,1	17,6±8,7	17,3±7,3B
	Médias	19,6±6,8	24,3±8,5	22,8±8,6	24,7±10	
HCM ($pg\ cel^{-1}$)	**30d**	37,1±5,5	37,6±9,2	40,2±11,1	50,8±38,3	41,7±21,5A
	60d	27,3±7,9	26±9,9	33,5±14,2	31,7±14,6	29,8±12,2B
	Médias	32,2±8,3	31,5±11,1	36,4±13,1	40,8±29,5	
VCM (μ^3)	**30d**	144,3±35,2	122,5±26,3	164,8±50,9	126,6±21,6	136,6±35,6B
	60d	199,9±33,2	171,5±36,2	188,2±45,2	186,5±40,3	186,5±38,6A
	Médias	170,5±44,2ab	143,1±38,9b	177,3±47,7a	156,6±44ab	

Valores são médias ± DP(n = 6 caixas/tratamento). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre pelo teste de Tukey (P < 0,05). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A contagem de leucócitos (Figura 4), linfócitos (Figura 5) e monócitos, apesar de não ter diferido (P > 0,05) na interação entre os tratamentos e o tempo, para as médias das amostragens (30 e 60 dias) obteve-se diferenças (P < 0,05). Nos três casos, as médias dos peixes alimentados até os 60 dias foram maiores em relação aos 30 dias (Tabela 4). Já as contagens dos eosinófilos e dos basófilos apresentaram resposta inversa, com maiores valores (P < 0,05) aos 30 dias de alimentação. Para as demais contagens, não houve diferenças (P > 0,05) em relação aos tratamentos, tempos de coleta e a interação de ambos.

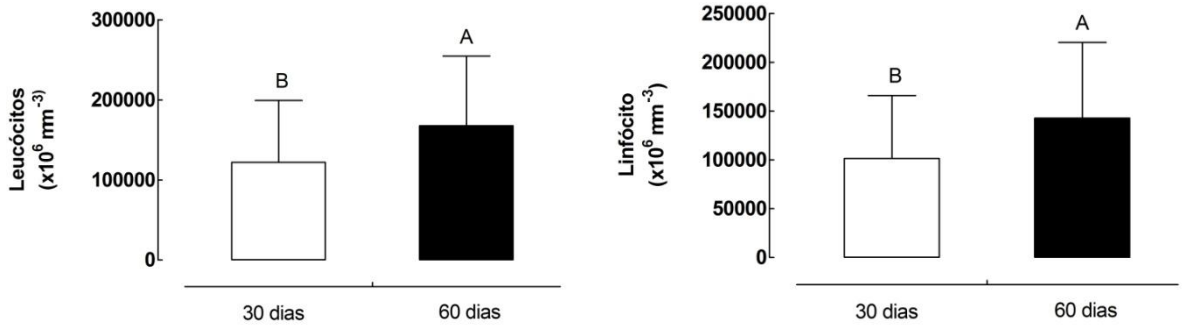


Figura 4 e 5. Contagem de leucócitos e linfócitos do sangue de tilápias (média ± desvio padrão) alimentadas com Actigen® (ACT) aos 30 e 60 dias de experimento. Barras seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 4. Contagens totais e diferenciais de leucócitos de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de Actigen® avaliados aos 30 e 60 dias de experimento.

	Dias Experimentais	Actigen (%)				
		0 (Controle)	**0,04**	**0,06**	**0,08**	Médias
Eritroblasto ($x10^6$ mm^{-3})	**30d**	4033±7236	109±379	335±836	665±1572	1285±3954B
	60d	21386±13402	33921±26068	21142±21142	28558±21140	26252±19194A
	Médias	12710±13766	17015±24966	10738±13493	14611±20442	
Leucócito ($x10^6$ mm^{-3})	**30d**	118413±63422	151950±97216	76601±50387	141671±76112	122158±77205B
	60d	172716±97074	181531±103720	155146±66563	161072±85462	167616±87042A
	Médias	145564±84852	166740±99466	115873±70304	151371±79761	
Trombócito ($x10^6$ mm^{-3})	**30d**	32261±22849	41158±37039	31309±29205	23303±17919	32008±27548
	60d	26785±16180	36681±21204	42115±29041	25422±21524	32751±22835
	Médias	29523±19563	38919±29604	36712±29013	24362±19399	
Linfócito ($x10^6$ mm^{-3})	**30d**	99787±56877	124195±78407	62286±39347	119720±64826	101497±64432B
	60d	138365±82995	161873±99592	134679±56331	135614±72473	142724±77552A
	Médias	118238±71671	143034±89745	98483±60210	127667±67733	
Neutrófilo ($x10^6$ mm^{-3})	**30d**	10727±8521	15955±97216	10584±12610	15838±13209	13276±12335
	60d	9679±8997	9557±8653	109871±8474	14541±14116	11223±10223
	Médias	10226±8566	12756±12200	10785±10509	15189±13386	
Monócito ($x10^6$ mm^{-3})	**30d**	4877±3352	9416±8159	2992±3515	3304±3091	5147±5483B
	60d	14015±11829	9904±8401	9181±10107	10254±7177	10771±9353A
	Médias	9248±9540	9660±8103	6087±8047	6779±6466	
Eosinófilo ($x10^6$ mm^{-3})	**30d**	1294±1862	1411±2871	293±514	1495±2484	1123±2118A
	60d	0	197±461	0	105±364	77±299B
	Médias	675±1473	804±2104	147±386	800±1876	
***CGE ($x10^6$ mm^{-3})**	**30d**	598±1058	0	116±215	600±1510	329±939
	60d	149±354	0	299±702	198±685	162±519
	Médias	383±818	0	208±516	399±1165	
Basófilo ($x10^6$ mm^{-3})	**30d**	1129±1848	973±1761	329±532	714±894	786±1368A
	60d	484±1080	0	0	359±715	205±650B
	Médias	820±1531	487±1316	164±405	536±812	

Valores são médias ± DP (n = 6 caixas/tratamento). Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre pelo teste de Tukey (P < 0,05).*CGE = Células granulocíticas especiais

3.1.3 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Os resultados observados aos 30 e 60 dias no desempenho produtivo de juvenis de tilápia alimentadas com as dietas contendo diferentes níveis de Actigen® (ACT) estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente, sendo que não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos em ambos os períodos analisados. No entanto, pode-se observar que aos 30 dias houve um aumento numérico no tratamento com 0,04% de ACT em relação ao controle e aos outros tratamentos nos índices de PF e GP e uma melhora na CA. Já aos 60 dias, também houve uma tendência de melhora, embora sem diferenças ($P > 0,05$), para PF, GP, TCE e CA no tratamento com 0,06% de ACT em relação aos outros tratamentos.

Tabela 5. Médias dos índices zootécnicos: peso final (PF), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), conversão alimentar diária (CAD) e conversão alimentar (CA), de tilápias alimentadas com Actigen® (ACT) durante 30 dias.

ACT (%)	0	0,04	0,06	0,08
PF (g)	80,6 ± 9,9	84,8 ± 13,7	72,8 ± 16,2	67,3 ± 15,3
GP (g)	39,6 ± 5,7	40,6 ± 5,4	37,5 ± 10,7	34,2 ± 8,2
TCE (% dia^{-1})	2,25 ± 0,2	2,21 ± 0,3	2,40 ± 0,4	2,40 ± 0,4
CAD (g dia^{-1})	2,36 ± 0,2	2,40 ± 0,2	2,23 ± 0,6	2,20 ± 0,3
CA	1,81 ± 0,3	1,79 ± 0,2	1,80 ± 0,1	1,98 ± 0,3

Valores são médias ± DP (n = 6 caixas/tratamento).

Tabela 6. Médias dos dados dos índices zootécnicos: peso final (PF), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), conversão alimentar diária (CAD) e conversão alimentar (CA), de tilápias alimentadas com Actigen® (ACT) durante 60 dias.

ACT (%)	0	0,04	0,06	0,08
PF (g)	114,8 ± 18,7	114,1 ± 23,8	119,3 ± 17,2	115,1 ± 27,4
GP (g)	76,6 ± 13,4	75,8 ± 15,3	80,6 ± 14,7	76,7 ± 21,6
TCE (% dia^{-1})	1,86 ± 0,3	1,85 ± 0,3	1,89 ± 0,3	1,83 ± 0,3
CAD (g dia^{-1})	2,66 ± 0,4	2,49 ± 0,3	2,58 ± 0,3	2,41 ± 0,4
CA	2,1 ± 0,2	2,01 ± 0,2	1,97 ± 0,4	1,93 ± 0,2

Valores são médias ± DP (n = 6 caixas/tratamento).

3.2 EXPERIMENTO 2

3.2.1 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

Avaliando a atividade respiratória de leucócitos em relação à interação das concentrações de ACT e do tempo de coleta não houve diferença (P > 0,05). Porém, as médias das concentrações nos tempos de coleta foram diferentes entre si (P < 0,05), sendo que a maior produção de espécies reativas de oxigênio foi aos 5 dias após o desafio com o LPS, seguido de 12 dias após o desafio e 60 dias de experimento. Para as médias de cada concentração, independente do período de amostragem, a média da concentração de 0,04% ACT foi maior (P < 0,05) que o controle (0%) e a média da concentração de 0,06% ACT (Tabela 7).

A atividade de lisozima foi influenciada tanto para a interação concentração x tempo, quanto para as médias do tempo de coleta (Figura 6), exceto aos 5 dias após o desafio. Este parâmetro apresentou valores mais elevados aos 5 dias após o desafio em relação aos demais períodos, exceto na concentração de 0,08%. Para as médias dos dias de coleta, independente dos tratamentos, o período de 5 dias após o desafio apresentou a maior média (P < 0,05) em relação aos demais, que não

tiveram diferença entre si. Para a análise de complemento, não foi verificada diferenças (P > 0,05) (Tabela 7).

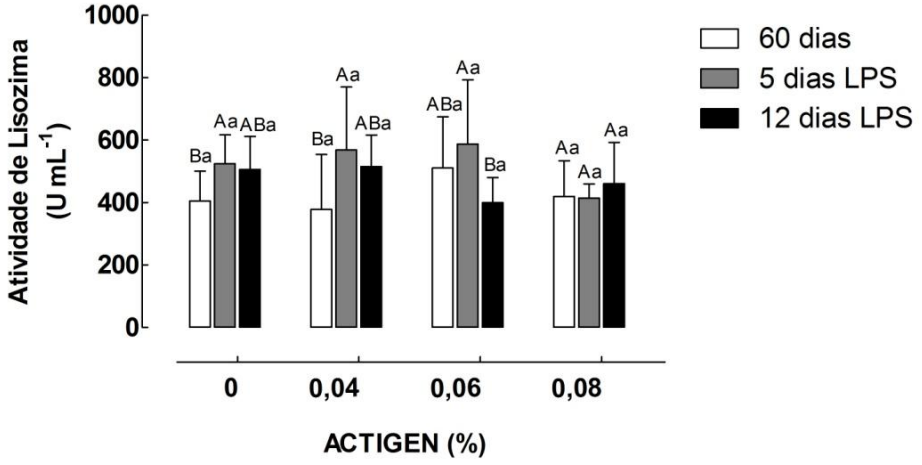


Figura 6. Média dos valores de atividade de lisozima do sangue de tilápias (média ± desvio padrão) alimentadas com Actigen® (ACT) aos 60 dias de experimento, 5 e 12 dias de inoculação com LPS. Letras maiúsculas nas barras denotam diferenças significativas entre os períodos de coleta e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre as concentrações de ACT (P < 0,05).

A albumina, proteína e índice de A:G não tiveram diferenças (P > 0,05) nas interações tempo x concentração, diferente da globulina que foi influenciada pela interação (Tabela 7). Analisando separadamente, as médias do tempo de coleta, a proteína, a globulina e o índice A:G foram maiores aos 12 dias de desafio (P < 0,05) em relação aos demais tempos, ao contrário da albumina, que neste período resultou em média menor (P < 0,05) do que as do controle e 5 dias de desafio. Em relação às médias das concentrações, independente do tempo, a proteína foi maior (P < 0,05) no grupo que recebeu 0,04% ACT em relação aos grupos de maiores concentrações. As repostas de globulina foram influenciadas pela interação do tempo x concentração aos 5 e 12 dias após o desafio, sendo que aos 12 dias os valores de globulina foram maiores (P < 0,05) em relação aos demais períodos e na concentração de 0,06% ACT os resultados foram os mais elevados também, porém diferindo (P < 0,05) apenas da concentração de 0,08% aos 5 dias e aos 12 dias diferiu de todas as concentrações (Figura 7).

Tabela 7. Parâmetros imunológicos e bioquímicos de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de Actigen® avaliados aos 60 dias de experimento, 5 e 12 dias após o desafio com LPS.

	Dias Experimentais	Actigen (%)				
		0 (Controle)	**0,04**	**0,06**	**0,08**	Médias
Burst (DO)	**60d**	0,22±0,03	0,26±0,04	0,25±0,03	0,28±0,02	0,25±0,04C
	5d LPS	0,58±0,05	0,65±0,06	0,56±0,05	0,6±0,05	0,6±0,06A
	12d LPS	0,48±0,06	0,52±0,07	0,46±0,04	0,49±0,04	0,49±0,06B
	Médias	0,43±0,16bc	0,47±0,17a	0,42±0,14c	0,46±0,13ab	
Complemento	**60d**	245±117,6	337,7±224,6	247,3±126,8	203,7±103,4	259,9±154,2
	5d LPS	248,5±105,2	370,3±229,9	451,5±330,3	233,5±104,5	330,9±226,8
	12d LPS	282,7±125	341±260,1	430,1±223,6	332±134,6	347,8±196,6
	Médias	259,6±113,5	350,6±229,7	369,5±245,3	251±121,4	
Albumina (g dL^{-1})	**60d**	1,49±0,82	1,32±0,37	1,24±0,49	1,34±0,47	1,36±0,58A
	5d LPS	1,26±0,25	1,21±0,36	1,14±0,13	1,141±0,15	1,18±0,24A
	12d LPS	0,89±0,19	0,93±0,1	0,84±0,13	0,82±0,31	0,87±0,2B
	Médias	1,24±0,61	1,14±0,33	1,04±0,32	1,12±0,4	
Proteína (g dL^{-1})	**60d**	4,6±1,25	4,28±0,69	4,03±0,82	4,59±0,92	4,40±0,3B
	5d LPS	4,58±0,74	4,64±1,03	3,57±0,59	4,04±0,42	4,21±0,5B
	12d LPS	5,45±0,63	6,45±0,47	5,43±0,46	5,55±0,43	5,72±0,5A
	Médias	4,88±0,5ab	5,12±1,2a	4,34±1,0b	4,73±0,8b	
Índice A:G	**60d**	2,35±0,57	2,08±1,18	2,49±0,91	2,62±0,91	2,4±0,87B
	5d LPS	2,74±0,79	2,92±0,79	2,16±0,6	2,62±0,64	2,59±0,72B
	12d LPS	5,21±1,61	6,0±1,0	5,63±1,28	6,88±2,63	5,92±1,71A
	Médias	3,23±1,57	3,76±1,99	3,69±1,93	3,68±2,35	

Valores são médias ± DP (n = 6 caixas/tratamento Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

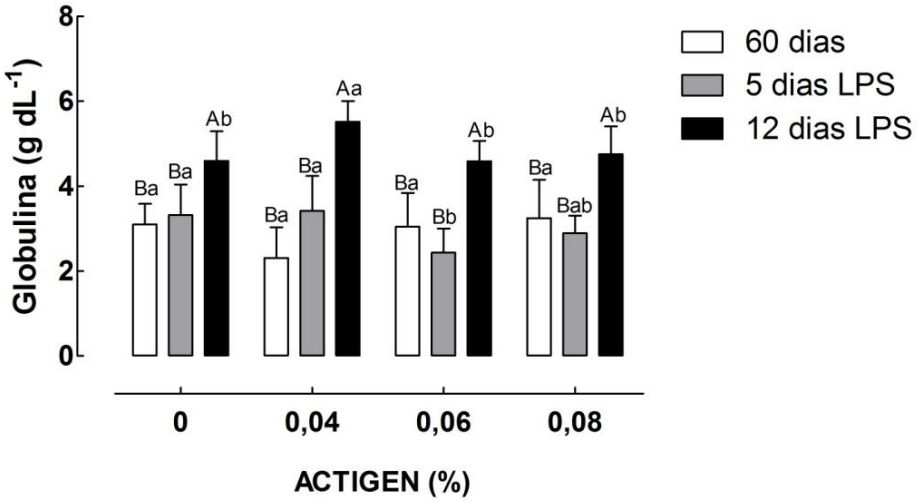


Figura 7. Média dos valores de globulina do sangue de tilápias (média ± desvio padrão) alimentadas com Actigen® (ACT) aos 60 dias de experimento, 5 e 12 dias de inoculação com LPS. Letras maiúsculas nas barras denotam diferenças significativas entre períodos de coleta e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre as concentrações de ACT (P < 0,05).

3.2.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

As respostas hematológicas (Tabela 8) demonstraram diferenças (P < 0,05) com interação apenas para a concentração de hemoglobina, sendo que aos 60 dias de experimento os valores do controle e 0,04% ACT foram menores (P < 0,05) que os demais tempos de coleta, só que não houve diferenças (P > 0,05) entre as concentrações. Em relação as médias da concentração de HGB nos tempos de coleta, a menor (P < 0,05) observada foi aos 60 dias.

A CHCM apresentou influência das concentrações nas médias dos tempos de coleta, obtendo aos 12 dias (29,8 g dL^{-1}) valores maiores, seguidos dos 5 dias (25,9 g $dL^{-1)}$ e 60 dias (17,3 g dL^{-1}).Os demais parâmetros, HCT, RBC, CHCM, HCM e VCM não apresentaram diferenças (P > 0,05) (Tabalea 8).

Tabela 8. Parâmetros hematológico de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de Actigen® avaliados aos 60 dias de experimento, 5 e 12 dias após o desafio com LPS.

	Dias Experimentais	Actigen (%)				
		0 (Controle)	0,04	0,06	0,08	Médias
HGB ($g\ dL^{-1}$)	60d	6,1±1,9	6,7±2,2	8,3±2,9	8,4±1,9	7,4±2,4B
	5d LPS	8,8±1,5	8,9±0,9	8,96±1,9	8,2±0,7	8,7±1,3A
	12d LPS	9,6±2,4	10,1±2,7	8,72±2,1	8,7±1,3	9,3±2,2A
	Médias	8,2±2,5	8,7±2,5	8,67±2,3	8,5±1,4	
HTC (%)	60d	46,8±8,4	40,7±7,4	43,6±9,5	41,1±5,9	43,1±2,8
	5d LPS	34,2±4,5	31,8±5,4	33,6 ± 1,7	33,7±4,3	33,3±1,0
	12d LPS	33,3± 3,7	34,1±4,6	30,9 ± 4,9	31,9±8,6	32,5±1,4
	Médias	38,1±7,6	35,5±4,6	36,0±6,7	35,6±4,9	
RBC ($x10^6\ mm^{-3}$)	60d	2,1±0,3	2,3±0,3	2,3±0,1	2,4±0,3	2,3±0,3
	5d LPS	2,2±0,5	2,3±0,2	2,3±0,4	2,5±0,3	2,3±0,4
	12d LPS	2,2±0,6	2,5±0,3	2,1±0,8	2,1±0,6	2,2±0,6
	Médias	2,2±0,5	2,4±0,3	2,2±0,5	2,3±0,4	
CHCM ($g\ dL^{-1}$)	60d	13,7±2,9	17,64±6,1	19,91±9,1	17,6±8,7	17,3±7,3C
	5d LPS	26,3±3,2	28,32±6,4	25,99±5,6	22,9±8,3	25,9±6,3B
	12d LPS	29,0±7,2	29,88±8,0	32,57±10,5	27,6±6,1	29,8±8,1A
	Médias	23,8±7,9	26,12±8,5	26,75±9,6	22,5±8,6	
HCM ($pg\ cel^{-1}$)	60d	27,3±7,9	28,1±7,5	33,5±14,2	31,7±14,6	30,3±11,7B
	5d LPS	40,6±8,4	40,3±9,5	40,2±18,8	32,2±11,9	38,3±12,9A
	12d LPS	41,2±10,0	41,4±7,8	41,9±9,8	42,9±11,3	41,9±9,4A
	Médias	36,6±10.7	37,1±10,0	38,4±14,9	35,4±13,4	
VCM (μ^3)	60d	199,9±33,2	171,5±36,2	188,2±45,2	186,5±40,3	186,5±38,6A
	5d LPS	154,9±25,2	147,1±37,4	150,6±34,2	142,4±27,6	148,7±30,8B
	12d LPS	148,0±26,9	143,2±27,1	148,9±61,0	159,1±52,3	149,6±43,6B
	Médias	164,1±34,7	152,0±34,7	159,4±49,8	162,2±43,5	

Valores são médias ± DP (n = 6 caixas/tratamento). Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Para as contagens de basófilos, CGE e monócitos não houve diferença (P > 0,05). Para as médias dos leucócitos, trombócitos, linfócitos e neutrófilos nos diferentes tempos de coleta houve diferença (P < 0,05), sendo que para estas células, 5 dias após o desafio os valores foram menores ou iguais em relação aos 12 dias após o desafio e sempre com valores menores em relação aos 60 dias de experimento. Já para os eritroblastos, a média foi menor aos 12 dias (3014 x $10^6\ mm^{-3}$) em relação aos 60 dias (26252 x $10^6\ mm^{-3}$) e 5 dias após o desafio (18843 x $10^6\ mm^{-3}$) (Tabela 9).

Tabela 9. Contagens total e diferencial de leucócitos de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de Actigen® avaliados aos 60 dias de experimento, 5 e 12 dias após o desafio com LPS.

	Dias Experimentais	Actigen (%)				
		0 (Controle)	0,04	0,06	0,08	Médias
Eritroblasto ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	21386±13402	33921±26068	21142±11992	28558±21140	26252±19194A
	5d LPS	22774±28374	15534±24292	20464±17133	16325±13461	18843±21055A
	12d LPS	3174±4331	5739±6624	799±1445	2095±3716	3014±4724B
	Médias	16138±20093	18480±23491	14516±15197	16047±18042	
Leucócito ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	172716±97073	181531±103720	155146±66563	161072±85462	167616±87042A
	5d LPS	136056±119134	84561±58680	120443±83768	145981±110770	122552±96393B
	12d LPS	172436±90150	123425±57680	102013±60727	104095±89576	125446±78390AB
	Médias	160059±101687	131133±84787	126549±72697	137991±96306	
Trombócito ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	26785±1618	36681±21204	42115±29041	25422±21524	32751±22835A
	5d LPS	18351±17375	8908±10755	19612±15826	24026±34875	17912±21864B
	12d LPS	30124±22471	24070±17251	19631±26807	30362±26467	26003±23062A
	Médias	24943±18871	23628±20151	27333±26127	26496±27510	
Linfócito ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	138365±82995	161873±99592	134679±56331	135614±72473	142724±77552A
	5d LPS	116440±93840	71429±49361	103764±73961	125476±93304	104976±80242B
	12d LPS	156873±86011	109615±52566	82559±54138	88982±75143	109510±71898AB
	Médias	136615±86892	115530±78861	107699±64229	117483±81104	
Neutrófilo ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	9679±8997	9557±8653	10987±8474	14541±14116	11223±10223A
	5d LPS	3576±4884	4390±4839	5739±6412	4446±4614	4541±5132B
	12d LPS	5866±4471	2236±2365	6065±12430	4196±4629	4538±6859B
	Médias	6291±6716	5423±6549	7640±9381	7829±10093	
Monócito ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	14015±11829	9904±8401	9181±10107	10254±7177	10771±9353
	5d LPS	15500±30249	8594±5765	10723±14176	14174±18712	12325±19114
	12d LPS	9321±4748	11333±8588	13069±11455	10870±13028	11152±9682
	Médias	13020±19010	9982±7599	10931±11800	11792±13527	
Eosinófilo ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	0	197±461	0	105±364	77±299B
	5d LPS	156±424	148±491	53±184	988±1336	340±824A
	12d LPS	376±700	0	94±313	47±154	126±401AB
	Médias	177±482ab	114±383ab	48±203b	389±906a	
CGE ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	149±354	0	299±702	198±685	162±519
	5d LPS	0	0	0	196±509	50±263
	12d LPS	0	0	0	0	0
	Médias	48±208	0	102±425	135±494	
Basófilo ($x10^6$ mm^{-3})	**60d**	484±1080	0	0	358±715	205±650
	5d LPS	384±1332	0	165±414	699±1327	319±978
	12d LPS	0	242±574	225±748	0	120±473
	Médias	292±994	83±347	127±479	363±904	

Valores são médias ± DP (n = 6 caixas/tratamento). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

A atividade respiratória dos leucócitos é aferida por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células de defesa dos peixes durante o processo inflamatório (fagocitose), e é um ótimo indicador do aumento da resistência imunológica animal, uma vez que estas EROs irão promover a formação de potentes componentes bactericidas (CEROZI, 2012). No presente estudo, a produção de espécies reativas de oxigênio não foi influenciada (P>0,05) pela administração do imunoestimulante nas diferentes concentrações, nos dois experimentos. Mas, no primeiro experimento, independente do período de administração das FAMP, a adição de 0,06% ACT (0,3 DO) e 0,08% ACT (0,3 DO) promoveram maior atividade respiratória em relação às demais concentrações.

No segundo experimento, o LPS usado como fator de desafio mostrou-se eficiente, pois independente das concentrações das FAMP, as médias foram maiores aos cinco dias da inoculação (0,6 DO), seguida de 12 dias de inoculação (0,49 DO) e antes do desafio (60 dias de experimento, 0,25 DO). Isto indica que o LPS estimula a fagocitose e a produção de EROs precocemente, consequentemente, pode ser considerado um componente para desafio, pois aumenta os componentes inatos de defesa. A atuação precoce do LPS é confirmada após a avaliação com 12 dias de inoculação, uma vez que os valores de DO da atividade respiratória de leucócitos foram menores que após cinco dias de desafio. Em outro estudo, robalos suplementados com dietas contendo MOS, também responderam com melhora do estado imunológico (TORRECILLAS et al., 2006).

O LPS bacteriano, também conhecido como endotoxina, é considerado um importante fator de virulência, e é responsável pelos efeitos letais e as manifestações clínicas de doenças em humanos e animais. Entretanto, os peixes são muito resistentes ao choque endotóxico, sendo este um componente ideal como fator de desafio, uma vez que estimula os componentes de defesa, mas não causa doença ou mortalidade. O reconhecimento do LPS ocorre por receptores do tipo “Toll-like” (TLR), e em peixes estes receptores não estão totalmente estabelecidos,

mesmo assim o LPS pode induzir a expressão de citocinas e proteínas de fase aguda, além de efeitos imunológicos, patológicos, fisiológicos e neuroendócrinos (SWAIN et al., 2008), o que pode ser evidenciado quando administrados após imunoestimulantes. O LPS é conhecido por estimular a produção de proteínas, como as proteínas do sistema complemento e lisozima, e células, tais como linfócitos T e B e macrófagos, atuando diretamente no aumento dos parâmetros inatos de defesa e indiretamente nos parâmetros específicos de defesa.

O sistema imune inespecífico dos peixes reconhece substâncias exógenas por meio de receptores existentes nas células de defesa, que identificam proteínas e moléculas características de microrganismos e que não são encontradas na superfície celular de organismos multicelulares. Os imunoestimulantes, muitas vezes apresentam em sua composição componentes moleculares característicos de microrganismos, assim após seu reconhecimento, ocorre aumento dos componentes de defesa (MAGNADÓTTIR, 2006).

Os resultados da atividade de lisozima diferiram ($P < 0,05$), independente da administração de FAMP, sendo que aos 60 dias os resultados foram maiores que aos 30 dias (432,4 e 360,3 U mL^{-1}, respectivamente). No segundo experimento, a atividade de lisozima foi influenciada tanto para a interação concentração x tempo, quanto para as médias do tempo de coleta, exceto aos 5 dias após o desafio. Este parâmetro apresentou valores mais elevados aos 5 dias de inoculação em relação aos demais períodos, exceto na concentração de 0,08%. Para as médias dos dias de coleta, independente dos tratamentos, o período de 5 dias após o desafio obteve a maior média ($P < 0,05$) em relação aos 60 dias e numericamente maior que aos 12 dias, confirmando novamente que o LPS atua de forma precoce uma vez que os valores de 5 dias de inoculação foram maiores que aos 12 dias de inoculação e 60 dias de experimento.

No primeiro experimento a adição de 0,04% ACT promoveu médias das concentrações numericamente maiores em relação aos demais tratamentos para o complemento, sendo a média maior ($P < 0,05$) aos 30 dias de coleta. No segundo experimento, o complemento não foi influenciado ($P > 0,05$) pela interação concentração x tempo, mas a média das concentrações foram maiores numericamente com 0,06%.

Correlação positiva entre atividade de lisozima e as diferentes concentrações de MOS foi detectada, embora não foram encontradas diferenças significantes. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em carpa comum e truta arco-íris (STAYKOV, 2004; STAYKOV et al., 2007), sugerindo que MOS ativa e facilita o processamento de antígenos e estimula as fases iniciais da resposta imunitária (MORAN, 2004). Reduz os níveis de mortalidade e aumenta a atividade bactericida, a lisozima, o complemento (via alternativa) e as concentrações de anticorpos (STAYKOV, 2004).

Para o robalo europeu, a inclusão de 0,4% de MOS à dieta, aumentou o crescimento, ativou o sistema imunitário e aumentou a resistência à infecção bacteriana inoculada diretamente no intestino, que é um dos locais principais de infecção em peixes. Staykov et al. (2005) e Zhou; Li (2004) também relataram melhora significante de vários indicadores do estado imunológico com inclusão de 2,4 g kg^{-1} de MOS à dieta de carpas.

Gernat (2011) depois de administrar ACT em frangos de corte, relatou aumento na resposta do sistema imunológico, com o aumento de leucócitos, heterófilos e linfócitos, melhora na integridade intestinal e menor mortalidade. Um aumento do sistema imune de frangos com a inclusão do ACT também foi relatado por Munyaka et al. (2011), aumentando o ganho de peso e melhora a conversão alimentar de frangos de corte. Da mesma maneira, o uso de ACT melhora o estado do sistema imunológico, aumentando a atividade dos leucócitos e diminui a mortalidade de frangos de corte (SARA et al., 2012).

A média das concentrações entre as amostragens da globulina e do índice A:G aos 60 dias foi maior ($P < 0,05$) em relação aos 30 dias de experimento. Já para albumina, proteína e índice de A:G não houve diferenças ($P > 0,05$), nas interações tempo x concentração no primeiro experimento. Analisando separadamente, as médias do tempo de coleta, a proteína, a globulina e o índice A:G foram maiores aos 12 dias de desafio ($P < 0,05$) em relação aos demais tempos, ao contrário da albumina, que neste período resultou em média menor que as do controle e 5 dias de desafio. Em relação às médias das concentrações, independente do tempo, a proteína foi maior ($P < 0,05$) no grupo que recebeu 0,04% ACT em relação aos grupos de maiores concentrações. As repostas de globulina foram influenciadas pela

interação do tempo x concentração aos 5 e 12 dias após o desafio, sendo que aos 12 dias os valores de globulina foram maiores (P < 0,05) em relação aos demais períodos e na concentração de 0,06% ACT os resultados foram os mais elevados também, porém diferindo (P < 0,05) apenas da concentração de 0,08% aos 5 dias e aos 12 dias diferiu de todas as concentrações.

Os valores médios de proteína de referência para tilápias saudáveis foram obtidos por Hrubec et al. (2000) em tilápias híbridas (*Oreochromis niloticus* x híbrido entre *O. mossambicus* x *O. aureus*), por Chen et al. (2003) em tilápias-do-nilo e por Mauel et al. (2007) em tilápias híbridas (*O. aureus* x *O. niloticus*), com médias de 3,0 a 7,7 g dL^{-1}. Os valores de proteína do presente trabalho se encontraram dentro dos valores normais para a espécie, portanto, a dieta com as diferentes concentrações de ACT não afetaram esse parâmetro. Como a concentração de proteína total se deve primariamente a aumentos ou diminuições na concentração de albumina, principal constituinte das proteínas totais (RAVEL, 1997), então se supõe que a albumina também não foi influenciada pelas dietas. Já se houver a falta de aminoácidos essenciais à síntese, decorrente de uma nutrição desbalanceada, pode ocorrer a diminuição dos níveis de albumina. A avaliação deste parâmetro está associada à condição de higidez, metabolismo proteico e à condição nutricional dos animais (COLES, 1984). Neste estudo, o fornecimento das FAMP não interferiu nos valores de proteínas plasmáticas e albumina, demonstrando a manutenção da homeostasia dos fluídos corpóreos destes animais.

Os níveis de proteína no plasma podem ser modificados poucas horas após o início da reação inflamatória e durar por vários dias, dependendo da intensidade do estímulo (WHITE et al., 1981; QUINTANA, 2002). O aumento do estresse e inflamação causa um aumento na produção de globulinas, alterando a concentração de proteína plasmática total (THOMAS, 2000). O aumento das globulinas no soro possui grande importância para o mecanismo de defesa, com consequente redução da proporção albumina-globulina (SAHOO, MUKHERJEE, 2001). Estudos demonstram que peixes infectados por bactérias ou por parasitos reduziram os níveis de proteínas do sangue (BOON et al., 1990). Foi observado o aumento da proteína plasmática total em truta arco-íris alimentadas com prebióticos por sete dias (SIWICK et al., 1994) e *Labeo rohita* suplementados durante 28 e 42 dias (MISRA et

al., 2006), indicando melhor estado imunológico em peixes, uma vez que a lisozima e o complemento e outras proteínas de defesa estão incluídas nos valores da proteína plasmática total.

Alguns estudos realizados têm destacado os efeitos positivos do ACT na nutrição de suínos, com uma dose de 0,04%. Corção et al. (2011 a, b) relataram que o uso de ACT em suínos levou à melhora dos parâmetros de crescimento e estado de saúde, após a realização de teste usando *Salmonella* e *Escherichia coli.* Os efeitos do ACT foram comparados com um antibiótico promotor do crescimento, resultando em melhor ganho de peso, melhor conversão alimentar e uma redução no consumo de ração em porcos que foram tratados com ACT (BAGUS et al., 2011).

4.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

As oscilações dos valores hematológicos em peixes são influenciadas pelos fatores exógenos como a temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, pH, estresse, ciclo sazonal e fatores endógenos como o sexo, estádio de maturação gonadal, estado nutricional e doenças. Essa variação ocorre entre espécies e também entre indivíduos da mesma espécie, de acordo com as condições fisiológicas dos animais (RANZANI-PAIVA, 1991).

A suplementação das tilápias com o ACT influenciou significantemente nas médias das concentrações de hemoglobina (HGB), número total de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), sendo maiores ($P < 0,05$) aos 30 dias em relação aos 60 dias. Já para o hematócrito (HCT) e o volume corpuscular médio (VCM) ocorreu o inverso, com médias maiores aos 60 dias. A avaliação dos parâmetros hematológicos dos peixes, como HCT, RBC, CHCM e HCM avaliam a capacidade dos animais em responder às demandas energéticas em situações adversas e consequentemente avalia seu estado fisiológico.

As respostas hematológicas apresentaram diferenças ($P < 0,05$) com interação apenas para a HGB no segundo experimento, sendo que aos 60 dias de experimento os valores do controle e 0,04% ACT foram menores que os demais tempos de coleta, mas não diferiram entre as concentrações. Em relação as médias

da concentração de HGB nos tempos de coleta foi menor aos 60 dias em ambos os experimentos. A HGB e RBC foram maiores ($P < 0,05$) nas médias das concentrações (independente do tempo) de 0,08% ACT em relação ao controle (0%), não diferindo ($P > 0,05$) entre os outros tratamentos do primeiro experimento. Como os eritrócitos são constituintes da série vermelha sanguínea e contém hemoglobina, cuja função é o transporte de oxigênio e gás carbônico no organismo, qualquer deficiência em número ou forma dos eritrócitos pode comprometer a oxigenação nos tecidos (RANZANI-PAIVA et al., 2004; BILLER-TAKAHASHI, 2008). Porém ao diminuir o número de eritrócitos em conjunto com o aumento do seu volume resulta em uma espécie de compensação para o transporte de oxigênio da hemoglobina (TAVARES-DIAS, 2002). Neste experimento, as médias de RBC e de HGB foram menores e o VCM maior aos 60 dias de coleta em relação aos 30 dias. A redução de RBC, HGB e CHCM foi observada em tilápias do Nilo com ichthyophthiriasis e saprolegniosis, ocorrendo o aumento de VCM, que é a primeira resposta a fim de compensar a diminuição do número de eritrócitos, pois eritrócitos maiores transportam maiores quantidades de hemoglobina (TAVARES-DIAS, 2002).

Os índices hematimétricos demonstram o estado fisiológico do animal. O VCM e a HCM derivam dos primários (HGB, HCT e NE) (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), sendo que o VCM está relacionado com a dinâmica cardíaca e com o fluxo sanguíneo e a HCM demonstra como está a função respiratória (HOUSTON, 1990). A HGB e CHCM variam inter e intraespécie, sendo que tais variações podem ser atribuídas a fatores externos (RANZANI-PAIVA, 1991). Aos 30 dias, os peixes que ingeriram dietas com 0,08% de ACT, apresentaram valores maiores de CHCM e HCM em relação ao grupo controle, seguindo o mesmo padrão da HGB, diferindo apenas na média, que aos 60 dias os valores foram menores ($P < 0,05$) em relação às demais coletas nos dois experimentos. O VCM diferiu ($P < 0,05$) na média de concentração de 0,06% ACT em relação a 0,04% ACT e numericamente maior em relação aos demais tratamentos, sendo que aos 60 dias a média da concentração de VCM foi maior que aos 30 dias. Para o VCM também não houve diferença estatística entre os tratamentos, mas entre as médias, aos 60 dias (186,5±38,6 μ^3) nos dois casos o VCM foi maior em relação às demais coletas. Sado et al. (2014) observou aumento no VCM para pacus alimentados com diferentes concentrações de MOS

(0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0% MOS), apresentando 172 ± 23,6 ƒL aos 42 dias e 218,3 ± 15,0 ƒL ao final do experimento, aos 63 dias.

O hematócrito (HCT) representa o percentual de glóbulos vermelhos em relação ao volume de sangue correspondente, e seu aumento pode ser relacionado a condições estressantes, entre outros (BARTON, 2000; BRANDÃO et al., 2006). Esse parâmetro pode, em parte, revelar o nível de estresse a que os peixes estão submetidos, embora possa variar na presença de diferentes agentes estressantes (MARTINS et al., 2002), tais como os manejos de produção, doenças, alterações ambientais e desafios. Os valores percentuais de HCT, em ambos os experimentos do presente trabalho, apresentam-se dentro da média dos teleósteos que foi de 17,0 a 57,0% (TAVARES-DIAS, 2003) e se assemelham aos valores obtidos em tilápias-do-Nilo infectadas com ictioftiríase branquial e saprolegniose (TAVARES-DIAS et al., 2002b), à tilápias-do-Nilo, parasitadas e não parasitadas (GHIRALDELLI et al., 2006), em jundiá (TAVARES–DIAS et al., 2002a) e em cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) (RANZANI-PAIVA et al., 2005).

Os valores de HTC dos peixes aos 60 dias estavam mais elevados que aos 30 dias, por outro lado, o RBC aos 30 dias apresentou-se mais elevado que aos 60 dias, diferindo ($P < 0,05$), apesar de apresentar menos células. Assim, o aumento do HCT aos 60 dias ocorreu devido ao aumento de volume dos eritrócitos, evidenciado pelos valores aumentados do VCM, como encontrado por Sado et al. (2014) em pacus. O aumento do volume das células é característica de célula jovem, indicando que a administração de FAMP por 60 dias influenciou a produção e liberação para circulação de eritrócitos jovens (por meio do aumento da produção das células e por contração esplênica) que será fundamental para manutenção da homeostase em situações em que o metabolismo e a demanda energética estão aumentados. O aumento do HTC é importante para situações em que há aumento da demanda energética (fatores estressantes), assim, pode-se concluir que a administração de FAMP por 60 dias melhora a resistência aos fatores estressantes, pois houve um aumento ($P < 0,05$) da média do HTC aos 60 dias em relação aos 30 dias e numérico em relação aos 5 e 12 dias após a inoculação.

Aos 5 e 12 dias após o desafio com LPS, os parâmetros hematológicos não apresentaram alterações na interação entre os tratamentos e os tempos de coleta.

Os peixes não apresentam sinais clínicos após a administração da endotoxina, neste experimento, e em outros mesmo em doses elevadas, tais como alterações na coloração do corpo, e as anormalidades comportamentais como é encontrado em mamíferos (NAYAK et al., 2008; WEDEMEYER et al., 1968), embora possa ser um potente agente anoréxico para os peixes, com redução do apetite por influência da expressão de genes relacionados com o apetite (VOLKOFF; PETER, 2004). Welker et al. (2007) não encontraram diferenças nos parâmetros hematológicos de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com 2,0 g MOS kg^{-1} de dieta em seis semanas. Sado et al. (2008) também não observaram diferenças nos parâmetros hematológicos de tilápias-do-Nilo alimentadas com 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% de inclusão de MOS na dieta por 42 dias. No mesmo modo, a inclusão de 2% de levedura desidratada (principal fonte de MOS) à dieta também não afetou parâmetros hematológicos em tilápia-do-Nilo (HISANO et al., 2007).

Nos mamíferos e peixes, doenças infecciosas ativam as células do sistema imunológico, mudando a percentagem de células do sangue circulante fornecido a defesa orgânica (BERTOLINI; ROHOVEC, 1992), necessitando identificar e quantificar as células sanguíneas responsáveis pela defesa em peixes, para compreender melhor a participação dessas células em processos patológicos. Dependendo das características da espécie e do meio ambiente, os linfócitos parecem ser o mais freqüente tipo de leucócitos no sangue periférico dos peixes (REHULKA, 1996).

Os leucócitos, eritroblastos, trombócitos, linfócitos e monócitos apresentaram valores maiores ($P < 0,05$) aos 60 dias em relação aos demais dias de coleta. Esta maior quantidade de leucócitos no sangue indica que os peixes possam ter sofrido influência das dietas suplementadas com ACT, sendo que com 0,04% ACT, os valores do número de leucócitos foram maiores, embora apenas numericamente, em relação ao controle. Isto mostra que os peixes alimentados com o ACT estavam com as células de defesa do organismo ativadas, pois segundo Tavares-Dias (2003), a presença de maior número de leucócitos no sangue pode indicar melhor resposta de defesa do organismo. O LPS e *Escherichia coli* injetados intraperitonealmente em *Pleuronectes platessa* triplicaram o número normal de leucócitos (MACARTHUR et al., 1984). Os estudos sobre a resposta inflamatória em peixes brasileiros

demonstraram que a carragenina (MARTINS, 2000) e o LPS são os principais estimuladores da migração de células até o momento (MARTINS, 2004).

No sangue periférico dos peixes, são encontrados eritroblastos (eritrócitos imaturos) e a maior concentração dessas células no sangue, indica maior atividade eritropoiética (HOUSTON; MURRAD, 1992). Esta concentração pode variar de 0 a 10%, podendo apresentar até 20% em situações de estresse, como alterações ambientais, doenças e manejo (LANE; THARP, 1980). Mudanças das concentrações de oxigênio têm implicações diretas na regulação da eritropoiese. Em situação de hipóxia, ocorre resposta aguda do organismo com liberação de eritrócitos pelo baço causando aumento de eritroblastos na circulação (VALENZUELA et al., 2003). O estresse leva à ação dos glicocorticoides no organismo dos peixes, sendo a concentração de cortisol no sangue elevada e com isso ocorrem as modificações fisiológicas e metabólicas, observadas como o aumento do RBC (VOSYLIENÉ, 1999). Em ambos os experimentos, apesar das médias do número de eritroblastos estarem mais elevadas aos 60 dias em relação aos demais dias de coleta, os valores se mantiveram dentro do normal (entre 0 a 10%).

Os trombócitos nos peixes possuem várias funções, como a resposta de coagulação de modo semelhante às plaquetas nos mamíferos (ROMBOUT et al., 1996), redução da predisposição à infecções (KOZINSKA et al., 1999) e realização de fagocitose (SLIERENDRECHT et al., 1995; HILL; ROWLEY, 1996). Como os valores de trombócitos estavam maiores aos 60 dias em ambos os experimentos, isso pode indicar que os animais nesse período estariam com a predisposição a infecções reduzida indicando também que o ACT teve uma influência positiva sobre os números de trombócitos encontrados. A predominância dessas células no foco inflamatório foi demonstrada em estudos de cinética celular em exsudato inflamatório induzido (JORGENSEN et al., 1993; MATUSHIMA; MARIANO, 1996), mas, os trombócitos são raramente encontrados quando não há estímulo antigênico (AFONSO et al., 1997). Embora os trombócitos e leucócitos sejam células de diferentes linhagens, sob o ponto de vista da patologia, esses têm sido agrupados na contagem diferencial e denominados células sanguíneas de defesa orgânica (TAVARES-DIAS et al., 2000a). A abundância de trombócitos no sangue de peixes saudáveis (TAVARES-DIAS; FAUSTINO, 1998; TAVARES-DIAS et al., 2000b, c, d)

e, e em infectados (TAVARES-DIAS, 2000a) foi relatado sendo considerado normal (TAVARES-DIAS, 2002). O aumento do número de trombócitos (trombocitose) pode ocorrer devido à contração esplênica, em que o baço sequestra de 1/4 a 2/3 do total de trombócitos para o compartimento circulante, o que resulta também no aumento do volume globular (TAVARES-DIAS, 2002).

A função dos linfócitos dos peixes depende da adaptação da membrana lipoproteica, portanto, a composição dos ácidos graxos e a temperatura ambiente estão descritas como fatores que determinam a fluidez e permeabilidade das membranas (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Nos tecidos, os linfócitos e macrófagos predominam na reação de defesa do organismo, porém, em situação de estresse o número de linfócitos circulantes diminui (IWAMA; NAKANISHI, 1996). Dessa forma, os linfócitos em peixes podem estar presentes no processo inflamatório, na resposta humoral e também mediada por células frente a diversas situações (IWAMA; NAKANISHI, 1996). Observou-se que houve predominância de linfócitos seguidos de neutrófilos e monócitos na contagem diferencial de leucócitos no primeiro experimento, semelhante ao observado por Tavares-Dias; Moraes (2004) e Azevedo et al. (2006). Pickering (1981) relatou que a queda de linfócitos pode estar relacionada com redução da capacidade do peixe de se defender contra agentes patógenos. Essa redução no número total de células brancas pode ser ainda justificada pela variação das células analisadas, sendo que os linfócitos, os quais estão relacionados à produção de anticorpos e resposta celular humoral, representam a quase a totalidade dos leucócitos. Resultados parecidos foram encontrados por Barton; Iwama (1991) ao constatarem a queda do número de células brancas totais e de linfócitos, pós-estresse. Alterações nos números de linfócitos e neutrófilos são consideradas respostas secundárias em diferentes tipos de estresse (CARNEIRO; URBINATI, 1998, MARTINS et al., 2000).

Os neutrófilos são componentes do sistema imunológico que formam a primeira linha de defesa celular contra agentes invasores e têm como função a fagocitose. No primeiro experimento, a média de neutrófilos foi maior ($P < 0,05$) aos 30 dias, já no segundo experimento, aos 60 dias observou-se a média de neutrófilos maior em relação aos 5 e 12 dias após a inoculação do LPS, evidenciando que o ACT deve promover ativação celular até os primeiros dias após o interrompimento

da alimentação com o suplemento. Os monócitos são células com função fagocitária e de eliminação de bactérias. São precursores de macrófagos e consideradas células essenciais à vida (FELDMAN et al., 2000). No segundo experimento apresentou-se maior aos 5 dias após a inoculação.

Os eosinófilos, CGE e basófilos apresentaram um número reduzido de células nos peixes em ambos os experimentos, sendo que no primeiro os valores das médias foram maiores aos 30 dias. No segundo experimento, o eosinófilo e basófilo apresentaram os valores das médias mais elevadas aos 5 dias após o desafio em relação aos demais períodos. Já o CGE foi maior aos 60 dias de experimento.

Mesmo quando não ocorrem alterações hematológicas significantes, a utilização de prebióticos pode promover outras alterações que culminem em melhoria no estado imunológico, tal como a diminuição nas populações de bactérias patogênicas. Determinados oligossacarídeos podem atuar diretamente sobre estas populações, ligando-se às fímbrias bacterianas utilizadas para fixação e tornando-as indisponíveis para a aderência no trato gastrintestinal, fazendo com que as bactérias sejam eliminadas por exclusão competitiva (SPRING et al., 2000; GIBSON; ROBERFROID, 1995). Estes estudos apresentados mostram que o ACT melhora os índices imunológicos e hematológicos.

A adição de prebióticos na dieta tem como objetivo aumentar a resistência a doenças e promover o crescimento dos peixes. No entanto, alguns resultados contraditórios encontrados na literatura indicam que o modo de ação ainda não é claro, além do tempo, a dosagem e forma de administração, uma vez que estas variantes podem causar efeitos negativos para peixes (YOUSEFIAN et al., 2012).

4. 3 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

A inclusão de Actigen® (ACT) na dieta levou a um aumento numérico para os índices de PF e GP e melhora na CA, dos peixes alimentados com 0,04% ACT em relação ao controle e aos outros tratamentos, entretanto não houve diferenças ($P > 0,05$) nos parâmetros de desempenho zootécnico aos 30 e 60 dias de experimento. Já aos 60 dias, também houve uma tendência de melhora, embora não significante, para PF, GP, TCE e CA no tratamento com 0,06% ACT em relação aos outros

tratamentos. A taxa de sobrevivência, durante o experimento, foi de 98%, sendo que após a administração do LPS, como fator de desafio, não ocorreram mortalidades.

Em estudo com a inclusão do ACT à dieta de aves, o peso corporal, o consumo de ração, a conversão alimentar, o rendimento de carcaça, a mortalidade e o ganho de peso não foram alterados (MELGAR et al., 2010). Por outro lado, Lea et al. (2011), testaram 0 g t^{-1} (controle), 200 g t^{-1}, 400 g t^{-1} e 800 g t^{-1} ACT na nutrição de frangos durante 42 dias. O uso de 200 g t^{-1} ACT, melhorou o ganho de peso (2847 g) em relação ao grupo controle (2515 g) e a conversão alimentar foi de 1,73 com ACT e 1,74 para o grupo controle. Em um estudo com poedeiras, a suplementação com o ACT melhorou também o peso final, a intensidade da coloração, o peso médio dos ovos, o consumo médio de ração/massa de ovos de 100g, o índice de conversão alimentar e o volume dos ovos. O uso de ACT reduziu significantemente a porcentagem de ovos com defeitos e as taxas de mortalidade (MUNYAKA et al., 2011).

Já em estudo com suínos, Bagus et al. (2011) compararam os efeitos de ACT com um antibiótico promotor do crescimento, e encontraram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar, consequentemente a redução no consumo de ração em suínos que foram tratados com 0,04% de ACT.

Para peixes, os estudos com o ACT são escassos, porém Torrecillas et al. (2015) relataram que a incorporação de 0,16% ACT na dieta do robalo europeu durante 8 semanas promoveu maior taxa de crescimento específico e comprimento, e estimulou ainda a seleção de células do intestino associadas à defesa imunológica e afetou beneficamente o metabolismo dos lipídios no fígado.

Já para a inclusão de MOS na dieta vários estudos demonstraram ausência de diferença para os parâmetros zootécnicos nos grupos alimentados com o prebiótico em peixes semelhante aos resultados deste estudo, bem como em esturjão do golfo do México (*Acipenser oxyrinchus*) alimentados 0,3% na dieta MOS (PRYOR et al., 2003), larvas de bagre do canal (*Ictalarus punctatus*) (MAHIOUS et al., 2006), híbridos de tilápia (GENC et al., 2007), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentados com 1,0% MOS (GRISDALE-HELLAND et al., 2008), bagre do canal (WELKER et al., 2007; PETERSON, 2010), para dourada (*Sparus aurata*) alimentados 0,2 e 0,4% MOS na dieta (DIMITROGLOU et al., 2010) e sargo (*Diplodus puntazzo*) (PICCOLO et al., 2013), bagre do canal alimentados 0,2% na

dieta MOS durante seis semanas não diferiram dos peixes alimentados com dieta controle, embora peixes suplementados apresentaram melhora da resistência quando desafiados por *Edwardsiella ictaluri* (PETERSON et al., 2010). Tilápia-do-Nilo alimentada com 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% MOS na dieta por 45 dias, não apresentaram melhora no crescimento, além de apresentar correlação negativa entre a a adição de MOS à dieta e o consumo alimentar (SADO et al., 2008). Vendemiatti et al. (2003) também não encontraram diferenças significantes nos parâmetros de crescimento da tilápia alimentada com 0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 9 e 12 kg t^{-1} MOS e também observaram correlação negativa entre ganho de peso e a inclusão de MOS.

No entanto, os efeitos dos prebióticos dietéticos na nutrição de peixes ainda são inconclusivos, pois em outros estudos foram observadas melhoras no desempenho zootécnico, tais como no híbrido de robalo (LI; GATLIN, 2005), carpa jian (ZHOU; LI, 2004), carpa comum (CULJAK et al., 2006; STAYKOV et al., 2005), bagre Europeu (BOGUT et al., 2006), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (STAYKOV et al., 2007; YILMAZ et al., 2007) e robalo europeu (TORRECILLAS et al., 2007), pregado (*Scophthalmus maximus*) (LI et al., 2008), camarão tigre (*Penaeus semisulcatus*) (GENC et al., 2007), lagosta europeia (*H. gammarus*) (DANIELS et al., 2006; 2007) e lagosta (*Astacus leptodactylus*) (MAZLUM et al., 2011).

A melhora nos índices de desempenho se deve ao fato do MOS ser uma glicomanoproteína não digerível derivada da parede celular de cepas selecionadas de leveduras vivas, *Saccharomyces cerevisiae*, constituindo uma fonte rica em manose disponível para adesão bacteriana, que adsorvendo os patógenos impede sua ligação à parede intestinal (GOUVEIA et al., 2006; NEWMAN, 1994; VENDEMIATTI et al., 2003). Quando a aderência das bactérias aos enterócitos é inibida, não há formação de colônias que possivelmente irão utilizar nutrientes e promover infecção das células intestinais (FERKET et al., 2002), com isso há melhora da saúde intestinal, aumento da integridade das vilosidades intestinais e, consequentemente, um melhor aproveitamento dos nutrientes (LI et al., 2008). O uso do ACT também tem a função de combater os organismos desfavoráveis do intestino, evitando a colonização, além de manter a função digestiva e atividade

enzimática, controlar a inflamação e melhorar o desempenho (XIAO et al., 2010; CHE et al., 2012). Outra vantagem em relação aos efeitos do MOS seria a inclusão de concentrações mais baixas do ACT do que o MOS, mostrando ainda melhorar o desempenho em condições desafiantes para o animal (SPRING et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

O uso do de frações ativas de mananoproteínas apresentou efeitos positivos sobre os parâmetros imunes, indicando uma possível ação benéfica no estado de saúde dos peixes, entretanto, ainda precisam de mais estudos para um melhor entendimento sobre seus efeitos nos mecanismos de defesa e desempenho.

6. REFERÊNCIAS

AFONSO, A.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. The leucocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 7, p. 335-348, 1997.

AZEVEDO T.M.P.; MARTINS M.L.; YAMASHITA M.M.; FRANCISCO C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, p. 41-49, 2006.

BAGUS, R. G.; BRUCAL, P. A.; KALAW, P.; YATCO, J. T.; FRIO, A. J. L.; KOCHER, A. The effect of Actigen^{TM} on post-wean pig performance compared with an antibiotic growth promoter. “Science and Technology in the Feed Industry” Conference. In: ALLTECH’S 27ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 27., 2011. **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2011.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emplasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1; n. 3-26, 1991.

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000.

BERTOLINI, J. M.; ROHOVEC, J. S. Electrophoretic detection of proteases from different *Flexibacter columnaris* strains and assessment of their variability. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 12, p. 121-128, 1992.

BILLER, J. D. **Respostas fisio-patológicas e desafio por Aeromonas hydrophila, em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano.** 2008. 106f. Dissertação (Mestre em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., MARZOCCHI-MACHADO, C. M., ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C., Hemolytic activity of alternative complement system as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 237-241, 2012.

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

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C; Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* **(**Holmberg**,** 1887) fed with β-glucan. **Brazilian Journal of Biology***,* v. 74, n. 3, p. 698-703, 2014.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, p. 771-781, 1973.

BOGUT, I.; MILAKOVIC, Z.; PAVLICEVIC, J.; PETROVIC, D. Effect of Bio-Mos on performance and health of European catfish, *Sillirus glanis*. In: ALLTECH'S 22ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 22., 2006. **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2006.

BOON, J. H.; CANNAETS, V. M. H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M. A..;CHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective Larvae of Anguillicola crassus on haematological parameters of European Eel (*Anguila anguila*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 87, n. 3, p. 243-253, 1990.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. V.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Alterações metabólicas, hematológicas e osmorregulatórias do matrinxã *Brycon cephalus* causadas pelo estresse de transporte. In: AQÜICULTURA BRASIL'98, Recife, 1998. **Anais...** v. 2. Recife, 1998. p.609-620.

CEROZI, B. S. **Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).** 2012. 81 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2012.

CHE, T. M.; SONG, M.; LIU, Y.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W.; VAN ALSTINE, W. G.; DAWSON, K. A.; PETTIGREW, J. E. Mannan oligosaccharide increases serum concentrations of antibodies and inflammatory mediators in weanling pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2784–2793, 2012.

CHEN, X.; WU, Z.; YIN, J.; LI, L. Effects of four species of herbs on immune function of Carassius auratus gibelio. **Journal of fishery sciences of China**, v. 10, p. 36–40, 2003.

COLES, E.H. Função hepática. In: COLES, E.H. (Ed.). **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. cap 7, p. 185-219.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Normas, padrões de qualidade e classificação das águas.** Resolução n° 357, de 17 de março de 2005.

CORÇAO, A. A. P.; HANNAS, M. I.; VEIGA, A. A. Use of Actigen^{TM}- Performance, Salmonella control and antimicrobial revitalization. “Science and Technology in the Feed Industry”. In: ALLTECH’S 27ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 27., 2011. **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2011.

CULJAK, V.; BOGUT, G.; HAS-SHON, E.; MILAKOVIC, Z.; CANEKI, K. Effect of Bio-MOS on performance and health of luvenile carp. In: ALLTECCH’S ANNUAL SYMPOSIUM, 2006. Nutrition and biotechnology in the feed and food industries: **Proceedings…** Lexington:, KY, USA, 2006. p. 153-161.

DANIELS, C.; BOOTHROYD, D.; DAVIES, S.; PRYOR, R.; TAYLOR, D.; WELLS, C. Bio-Mos® improves growth and survival of cultured lobsters. **Shellfish News**, Padstow, v. 21, p. 23-25, 2006.

DANIELS, C.; BOOTHROYD, D.; DAVIES, S.; PRYOR, R.; WELLS, C. Developing & understanding the use of pre-biotics in homarid lobster culture. **Aquaculture Health International**, Manukau, v. 8, p. 32-35, 2007.

DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D. L.; SPRING, P.; SWEETMAN, J.; MOATE, R.; DAVIES, S. J. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 300, n. 182-188, 2010.

DIMITROGLOU, A.; REYNOLDS, P.; RAVNOY, B.; JOHNSEN, F.; SWEETMAN, J. W.; JOHANSEN, J.; DAVIES, S. J. The effect of mannan oligosaccharide supplementation on Atlantic salmon smolts (*Samo salar* L.) fed diet with high levels of plant proteins. **Journal of Aquaculture Research & Development,** S1:011, 2011. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.S1-011>.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm’s Veterinaty Hematology.** 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. 1344p.

FERKET, P. R.; PARKS, C. W.; GRIMES, J. L. Mannan oligosaccharides *versus* antibiotics for turkeys. In: ALLTECH´S 18ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 18., 2002, Nottingham. Nutritional biotechnology in the feed and food industry: **Proceedings…** Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 43-63.

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

GENC, M. A.; AKTAS, M.; GENC, E.; YILMAZ, E. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 13, p. 156-161, 2007.

GERNAT, A. Actigen and Zn bacitracin: Comparative effects on performance, intestinal Integrity and immunity of broilers. PanAmerican School of Agriculture/Zamorano, Teguci- galpa, Honduras. In: ALLTECH'S 27ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 27., 2011. Science and Technology in the Feed Industry: **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2011.

GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M. L.; YAMASHITA, M. M.; GOMES, L. C.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; ARAUJOLIMA, C. A. R. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, p. 426-431, 2006.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, B. M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n.6, p. 1401-1412, 1995.

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

GOUVEIA, E. M. F.; SILVA, I. S.; ONSELEN, V. J. V.; CORRÊA, R. A. C.; JUNQUEIRA-SILVA, C. Use of mannanoligosacharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and this effects on *E. coli* inactivated in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 23–26, 2006. (Suppl. 4)

GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S. J.; GATLIN III, D. M. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharides, fructooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture,** Oxford, v. 283, p. 163-137, 2008.

HILL, D. J.; ROWLEY, A. F. The thrombaxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **British Journal of Haematology**, London, v. 92, p. 200-211, 1996.

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

HOOGE, D. M.; CONNOLLY, A. Meta-analysis summary of broiler chicken trials with dietary Actigen© (2009-2011). **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 10, p. 819-824, 2011.

HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis* Hybrid). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 29, p. 7–12, 2000.

HUNG, L. T. Building new aquafeeds: feeding for health and performance in Tra catfish (*Pangasiaodon hypophthalmus*). In: ALLTECH'S 28ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 28., 2012. **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2012.

HOUSTON, A. H., Blood and circulation. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B., Methods for fish biology. **American Fisheries Society**, Maryland, p. 273-334, 1990.

HOUSTON, A. H.; MURRAD, A. Erythrodynamics in goldfish, *Carassius auratus* L.: temperature effects**. Physiology Zoology**, v. 65, n. 1, p. 55– 76, 1992.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System.** San Diego: Academic Press, 1996.

JORGENSEN, J. B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar*, L. **Journal of Fish Diseases**, Stirling, v 16, p. 313-325, 1993.

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

KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. Relationship between the thrombocyte activity and the susceptibily of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydroplhila* infection in different seasons. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 43, p. 63-69-1999.

LANE, H. C.; THARP, T. P. Changes in the population of polyribosomal containing red cells of peripheral blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following starvation and bleeding. **Journal of Fish Biology**, v. 17, p. 75– 81, 1980.

LI, P.; GATLIN III, D. M. Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-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**, Oxford, v. 248, p. 197-205, 2005.

LI, Y., WANG, Y. J.; WANG, L.; JIANG, K. Y. Influence of several non-nutrient additivies on nonspecific immunity and growth of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p. 387-395, 2008.

LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Ed.). **Tilapia:** biology, culture, and nutrition. New York: Food Products Press, 2006. 678p.

MacARTHUR, J. I.; FLETCHER, T. C.; PIRIE, B. J. S.; DAVIDSON, R. J. L.; THOMSON, A. W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, London, 25: 69-81, 1984.

MAHIOUS, A. S.; GATESOUPE, F. J.; HERVI, M.; METAILLER, R.; OLLEVIER. F. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). **Aquaculture International**, v. 14, p. 219–229, 2006.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 137-151, 2006.

MĂLDĂRĂSANU, T. I.; SARA, A.; BENTEA, M.; MURESAN, C. The Influence of Some Prebiotics (Actigen, Bio-Mos) Administered in Laying Quails' feeds on Growth Performances and Egg Quality. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies,** v. 70, n. 2, p. 379-380, 2013.

MARTINS, M. L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) estressados.** 2000. 125 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2000.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. C. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (*Osteichthyes*: Characidae). **Acta Scientiarum**, Paraná, v. 22, n. 2, p. 545-552, 2000.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; NOMURA, D. T.; FENERICK, JR. J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples e consecutivos de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, p. 195-204, 2002.

MARTINS, M. L.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T.; FENERICK Jr, J.; RIBEIRO, K.; MIYAZAKI, D. M. Y.; CASTRO, M. P.; MALHEIROS, E. B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Orechromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.

MATUSHIMA, E. R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, p. 5-10, 1996.

MAUEL, M. J.; MILLER, D. L.; MERRILL, A. L. Hematologic and plasma biochemical values of health hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis nilotica*) aintained in a recirculating system. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 38, p. 420‑424, 2007.

MAZLUM, Y.; YILMAZ, E.; GENÇ, M. A.; GUNER, O. A preliminary study on the use of mannan oligosaccharides (MOS) in freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 juvenile diets. **Aquaculture International**, v. 19, n. 111-119, 2011.

MELGAR, A. N. V.; PERDOMO, O. A. F. **Efecto de Actigen® en las dietas de pollos de engorde sobre el rendimiento, inmunidad e integridad intestinal**: Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras, 2010. 23 p.

MISRA, C. K.; DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; PATTNAIK, P. Effect of long termadministration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, v. 255, n. 82–94, 2006.

MORAN, A.C. Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. In: ALLTECH'S 19ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 19., 2004. **Proceedings…** Nottingham University Press, Nottingham, UK., 2004.

MUNYAKA, P.; ECHEVERRY, H. M.; YITBAREK, A.; EINARSON, M.; SHARIF, S.; GUENTER, W.; HOUSE, J. D.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C. Toll-like receptors and cytokines profile of chickens supplemented with yeast derivate carbohydrates. In: ALLTECH'S 27ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 27., 2011. International Animal Health and Nutrition Industry: **Proceedings…** University of Manitoba, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Winnipeg. Lexington, KY, USA, 2011.

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

NAYAK, S. K.; SWAIN, P.; NANDA, P. K.; DASH, S.; SHUKLA, S.; MEHER, P. K.; MAITI, N. K. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology,** v. 24, p. 394-9, 2008.

NEWMAN, K. Mannan-oligosaccharides: natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. In: ALLTECH'S 17ND ANNUAL INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 17., 1994. Science and technology in the feed industry: **Proceedings…** Nicholasville, USA, 1994.

PETERSON, B. C. Effects of Bio-Mos on growth and survival of channel catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, p. 149-55, 2010.

PICCOLO, G.; CENTODOCATI, G.; BOVERA, F.; MARRONE, R.; NIZZA, A. Effects of mannan oligosaccharide and inulin on sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) in the context of partial fish meal substitution by soybean meal. Ital **Journal of Animal Science**, v. 12, n. 22, p. 133-8, 2013.

PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. London: Academic Press, 1981.

PRYOR, G. S.; ROYES, J. B.; CHAPMAN, F. A.; MILES, R. D. Mannanoligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico Sturgeon. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 65, p. 106-111, 2003.

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

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia de peixes. In: SANTOS, H. S. L. (Ed.). **Histologia de peixes**. São Paulo. FCAV-UNESP, 1991. 83 p.,

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, E. A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. S.; LIZAMA, M. A. P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. cap.4, p.89-120.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ROMAGOSA, E.; ISHIKAWA, C, M. Hematological parameters of 'CACHARA' *Pseudoplatystoma fasciatum* LINNAEUS, 1766 (osteichthyes, pimelodidae), reared in captivity. **Boletim do Instituto de Pesca,** Cananéia – SP, v. 21, n. 1, p. 47-53, 2005.

RAVEL, R. **Laboratório clínico:** aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 616p.

REHULKA, J. Blood parameters in common carp with spontaneous spring viremia (SVC). **Aquaculture**, v. 4, p. 175-182, 1996.

ROMBOUT, J. H. W.; KOUMANS-DIEPEN, J. C. E.; EMMER, P. M.; TAVERNE-THIELE, J. J.; TAVERNE, N. Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. **Journal of Fish Biology**, London, v. 49, p. 521-531, 1996.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantã**, São Paulo, v. 20, p. 329-334, 1947.

SADO, R. Y. **Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887)**. 2008. 136 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2008.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. Hematology of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 887) fed graded levels of mannan oligosaccharides (MOS). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 1, p. 30-39, 2014

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary 1,3 _-glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu *Labeo rohita* Hamilton. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 11, p. 683-695, 2001.

SARA, A.; BENTEA, M.; GABOR, E.; ANI (TOMA), A. The effects of Actigen® in broiler chicken nutrition. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, v. 69, p. 1-2, 2012.

SELVARAJ, V.; SAMAPATH, K.; SEKAR, V. Adjuvant and immunostimulatory effect of beta glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 1–2, p. 15–24, 2006.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Limnologia aplicada à aquicultura. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 70p.

SLIERENDRECHT, W. J.; LORENZEN, N.; GLAMANN, J.; KOSH, C.; ROMBOUT, J. H. W. M. Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v. 46, p. 349-360, 1995.

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

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

STAYKOV, Y. The influence of Bio-Mos on growth rate and immune status of common carp (*Cyprinus carpio*). In: ALLTECH'S SECOND ANNUAL AQUACULTURE MEETING, 2., 2004. **Meeting…** DUNBOYNE, Co. Meath. November, oral communication, 2004.

STAYKOV, Y.; DENEV, S.; SPRING, P. Influence of dietary mannan oligosaccharides (Bio-Mos®) on growth rate and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: HOWAL,B.; FLOS, R. (Ed.). **Lessons from the past to optimize the future.** Oostende, **European Aquaculture Society**, p. 431-432, 2005. (Special Publication, 35).

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 15, n. 2, p. 153-161, 2007.

SWAIN, P.; NAYAK, S. K.; NANDA, P. K.; DASH, S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 191-201, 2008.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 41, p. 25–139, 1994.

SPRING, P. Q.; WENKS, C.; CONNOLLY, A.; KIERS, A. A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 3, p. 1-11, 2015.

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

TAVARES, M. D.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinaria**, v. 14, p. 254-263, 1998.

TAVARES, M. D.; CAMPOS, E.; SANDRIM, E. F. S. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia,** v. 16, n. 1, p. 175-184, 1999.

TAVARES-DIAS, M. et al. Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (Piaractus mesopotamicus x Colossoma macropomum) (Osteichthyes: Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 17, p. 899-926, 2000a.

TAVARES-DIAS, M. et al. Hematological Characteristics of hybrid Florida Red Tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: 50ND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 50., 2000, Rio de Janeiro. **Proceedings…** Rio de Janeiro, Brasil, 200b. p. 533-541.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; MARTINS, M. L.; MORAES F. R. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae)

cultivadas intensivamente em "pesque-pague" do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 16, p. 76-82, 2000c.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; SCHALCH, S. H. C.; ONAKA, E. M.; QUINTANA, C. I. F.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), tratado com sulfato de cobre ($CuSO_4$). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 574-554, 2002a.

TAVARES-DIAS, M.; RODRIGUES, C.A.P.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; SANTANA, A.E. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2002b.

TAVARES-DIAS, M. **Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica.** 2003. 209 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

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

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm’s veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 891-989.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. S. Improved growth, immune stimulation and infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, 2006 (in press).

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

TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p. 525-544, 2014.

TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; CABALLERO, M. J.; ROBAINA, L.; MARIA JESÚS ZAMORANO, M. J.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. Effects of dietary concentrated mannan oligosaccharides supplementation on growth, gut mucosal immune system and liver lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42, n. 508-516, 2015.

VALENZUELA, A.; OYARZÚN, C.; SILVA, V. Blood cells of the *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): the leukocytes (*Elasmobranchii*, Scyliorhinidae). **Gayana,** v.67, n. 1, p. 130-136, 2003.

VENDEMIATTI, J. A.; COSTA, A. B.; CYRINO, J. E. P. Mananoligossacarídeos alimentares (MOS) como agentes profiláticos das infecções por *Edwardsiella tarda* em tilápia do Nilo. In: CONGRESO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2003, Zaragoza. **Anales…** Zaragoza: Universidad de Zaragoza, 2003. p. 123-140.

VOLKOFF, H.; PETER, R. E. Effects of lipopolysaccharide treatment on feeding of gold fish: Role of appetite regulating peptides. **Brain Research**, v. 998, p. 139-47, 2004.

VOSYLIENÉ, M. Z. The effects of heavy metals on haematological indices of fish (Survey). **Acta Zoologica Lituanica**, v. 9, p. 76-82, 1999.

WEDEMEYER, G.; ROSS, A. J.; SMITH, L. Some metabolic effects of bacterial endotoxin in salmonid fishes. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, v. 26, p. 115-22, 1968.

WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole cell yeast or yeast subcomponents. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 1, p. 24-35, 2007.

WHITE, A.; FLETCHER, T. C.; PEPYS, M. B.; BALDO, B .A. The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 69, n. 325-329, 1981.

WINTROBE, M. M. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. **Folia Haematol.**, Leipzig, v. 51, p. 32-49, 1934.

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

WRIGHT, S.; RAMOS, R.; TOBIAS, P.; ULEVITCH, R.; MATHINSON, A. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science.**, v. 249, p. 1431-1433, 1990.

XIAO, R.; POWER, R. F.; MALLONEE, D.; CROWDUS, C.; AO, T.; PIERCE, J. L.; DAWSON, K. A. Transcriptional signatures associated with biological functions of Bio-Mos® and Actigen® in broilers. In: IPSF ATLANTA, 2010. **Proceedings...** Atlanta, GA, USA, 2010. p. 76.

YASSUI, H.; AKINO, T.; YASUDA, T.; FUKAYA, M.; WAKAMURA, S.; ONO, H. Gomadalactones A, B and C: novel 3-oxabicyclo [3.3.0] octane compounds in the contact sex pheromone of the white-spotted longicom beetle*, Anoplophora malasiaca*, **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 2395-2400, 2007.
YILMAZ, E.; GENC, M. A.; GENC, E. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **The Israeli journal of aquaculture**, v. 59, n. 182–188, 2007.

YOUSEFIAN, M.; HEDAYATIFARD, M.; FAHIMI, S.; SHIKHOLESLAMI, M.; IRANI, M.; AMIRINIA, C.; MOUSAVI, S. E. Effect of prebiotic supplementation on growth performance and serum biochemical parameters of kutum (*Rutillus frisii kutum*) fries. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.7, p. 684-692, 2012.

ZHOU, X. Q.; LI, Y. L. The effects of Bio-Mos® on intestinal microflora and immune function of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* Var. *Jian*). In: ALLTECCH'S 20ND ANNUAL SYMPOSIUM, 20., 2004. Nutrition and biotechnology in the feed and food industries: **Proceedings…** Lexington, KY, USA, 2004. p. 24-26.