

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MANANOLIGOSSACARÍDEO NA ALIMENTAÇÃO DE
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): AVALIAÇÃO DE
INDICADORES IMUNOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E DE DESEMPENHO PRODUTIVO.
RESPOSTA AO DESAFIO COM *Lactococcus garvieae***

Rodolfo do Nascimento Rissi

Biólogo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MANANOLIGOSSACARÍDEO NA ALIMENTAÇÃO DE
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): AVALIAÇÃO DE
INDICADORES IMUNOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E DE DESEMPENHO PRODUTIVO.
RESPOSTA AO DESAFIO COM *Lactococcus garvieae***

Rodolfo do Nascimento Rissi

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Microbiologia Agropecuária.

2014

Rissi, Rodolfo do Nascimento
R596m Mananoligossacarídeo na alimentação de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): avaliação de indicadores imunológicos, hematológicos, bioquímicos e de desempenho produtivo. Resposta ao desafio com *Lactococcus garvieae* / Rodolfo do Nascimento Rissi. - - Jaboticabal, 2014
x, 75 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Fabiana Pilarski
Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Róberson Sakabe

Bibliografia

1. Prebiótico. 2. Imunologia. 3. Hematologia. 4. Parâmetros Zootécnicos. 5. Desafio Bacteriano. 6. Peixes. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Serviço de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MANANOLIGOSSACARÍDEO NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*): AVALIAÇÃO DE INDICADORES IMUNOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE DESEMPENHO PRODUTIVO. RESPOSTA AO DESAFIO COM *Lactococcus garvieae*

AUTOR: RODOLFO DO NASCIMENTO RISSI

ORIENTADORA: Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Centro de Aquicultura da Unesp / Jaboticabal/SP



Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. RÓBERSON SÁKABE

Universidade Federal Fluminense / Niterói/RJ

Data da realização: 24 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODOLFO DO NASCIMENTO RISSI – Nascido em 12 de abril de 1989, natural de Monte Azul Paulista, Estado de São Paulo, formado em Ciências Biológicas (Bacharelado / Licenciatura) no ano de 2010, pelas Faculdades Integradas Fafibe (atual Centro Universitário UNIFAFIBE) Bebedouro - SP. Durante a graduação estagiou na área ambiental, principalmente na avaliação de diferentes substratos para o crescimento inicial de espécies arbóreas nativas. Em março de 2012 iniciou o curso de Pós-graduação, ao nível de Mestrado, em Microbiologia Agropecuária na FCAV (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) - UNESP, campus de Jaboticabal - SP. Foi bolsista CAPES, desenvolveu estudos no Centro de Aquicultura da UNESP, especificamente no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, sobre a utilização de prebiótico na imunidade, hematologia, desempenho produtivo, digestibilidade e sobrevivência de peixes.

“Eu sou eu mesmo.
Divêrjo de todo mundo...
Eu quase que nada sei.
Mas desconfio de muita coisa.”

Guimarães Rosa
Grande Sertão Veredas

Aos meus pais Rosa e Pedro, pelo amor, confiança, educação e exemplo de honestidade, humildade, trabalho e família.

À minha irmã Priscila, pela ajuda, amor e carinho sempre.

À minha namorada Vanessa, por dividir este trabalho e todos os momentos, pela ajuda, paciência, cumplicidade e amor.

Dedico com carinho

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força, sabedoria e por cada novo dia.

Ao Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira, coordenador do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária pelo esforço incansável em manter, estimular e valorizar a pesquisa de seus alunos.

À orientadora Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski pela oportunidade.

À Prof.^a Dr.^a Elisabeth Criscuolo Urbinati, ao Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto e ao Prof. Dr. Róberson Sakabe membros da banca examinadora de qualificação e/ou defesa pela disponibilidade, experiência, dicas e conhecimentos transmitidos.

À todos os professores das disciplinas cursadas durante este período de pós-graduação pelos ensinamentos.

À todos os meus professores, desde a infância à graduação, pelos ensinamentos, amizade e por contribuírem fundamentalmente com minha formação e educação.

Ao Prof. Dr. Renato Galdiano Júnior, pelo aprendizado, orientação, confiança, amizade e oportunidade proporcionada na graduação e por ser exemplo de compromisso no trabalho de pesquisa e educacional.

Aos amigos Gustavo, Sílvia, Lindomar, Thaís, Nycolas e Larissa, pela ajuda insubstituível e competente durante a preparação do experimento, coletas e análises, pelos ensinamentos e amizade. Sucesso galera.

Aos profissionais José e Santiago pela grande ajuda, habilidade e experiência desempenhadas durante as coletas.

À Prof.^a Dr.^a Elisabeth Criscuolo Urbinati pela permissão do uso do laboratório (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal) e ao Rodrigo Yukihiro Gimbo pela atenção, amizade e enorme ajuda com as análises.

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro pelo empréstimo e permissão do uso das incubadoras e laboratório (Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos) e ao Thiago Matias Torres do Nascimento pela amizade, disponibilidade, atenção e orientação nesta etapa e desde o preparo da ração.

À piscicultura “Toca da Tilápia” pelo fornecimento dos peixes para o experimento.

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da UNESP: Márcio (Tilapicultura), Valdecir (Peixes Ornamentais), Márcio (Ranicultura), Roberto (Carcinocultura), Silvinha (Laboratório Central), Donizete, Sú e Elaine pelo auxílio nas mais diversas circunstâncias.

Ao Luizinho e ao laboratório de Biomassa do Departamento de Engenharia Rural pela disponibilidade em ceder o bloco para utilização.

À Biorigin pelo fornecimento do ActiveMOS®.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos, mesmo que não citados, que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
 2. REVISÃO DE LITERATURA.....	 4
2.1. A Tilápia.....	4
2.2. Componentes Imunológicos em Peixes.....	5
2.3. Mananoligossacarídeo.....	6
2.4. Digestibilidade.....	10
2.5. <i>Lactococcus garvieae</i>	12
 3. OBJETIVOS.....	 15
3.1. Objetivo Geral.....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
 4. MATERIAL E MÉTODOS.....	 16
4.1. Local de Realização do Experimento.....	16
4.2. Condições e Dietas.....	16
4.3. Avaliação Imunológica, Hematológica e Bioquímica.....	19
4.3.1. Amostragens.....	19
4.3.2. Imunologia Inata.....	19
4.3.3. Hematologia.....	21
4.3.4. Bioquímica Sanguínea.....	23
4.4. Desempenho Produtivo.....	23
4.5. Digestibilidade de Proteína.....	24
4.5.1. Dietas.....	24

4.5.2. Coleta e Processamento das Fezes.....	25
4.5.3. Determinação dos Coeficientes de Digestibilidade Aparente de Proteína.....	27
4.6. Resistência à Bactéria.....	27
4.6.1. Bactéria e Meio de Cultura.....	27
4.6.2. Desafios Bacterianos por Co-habitação.....	28
4.7. Análise Estatística.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Avaliação Imunológica, Hematológica e Bioquímica.....	30
5.1.1. Imunologia Inata.....	30
5.1.2. Hematologia.....	33
5.1.3. Bioquímica Sanguínea.....	42
5.2. Desempenho Produtivo e Digestibilidade de Proteína.....	45
5.3. Resistência à Bactéria.....	50
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS.....	56



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 02981/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Influência da suplementação alimentar com mananoligossacarídeo (MOS) nos parâmetros imunológicos e hematológicos da tilápia-do-nilo e resistência à bactéria *Lactococcus garvieae*"**, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.

Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius
%/dia: porcentagem ao dia
ALB: albumina
BAS: basófilos
BEA: bile-esculin agar
BHI: broth heart infusion
BHIA: brain-heart infusion agar
BHIB: brain-heart infusion broth
CAA: conversão alimentar aparente
CAD: consumo alimentar diário
CAT: consumo alimentar total
CD_{PB}: coeficiente de digestibilidade aparente de proteína bruta
células μL^{-1} : células por microlitro
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média
cm: centímetro
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP: consumo de proteína
Cr₂O₃: óxido de cromo III
C.V.: coeficiente de variação
DC-SIGN: dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin
DO: densidade óptica
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EOS: eosinófilos
EROs: espécies reativas de oxigênio
fL: fenolitros
g: grama
G+M: glicana + manana
g dL⁻¹: grama por decilitro
GI: glicana insolúvel

g L⁻¹: grama por litro
GLOB: globulinas
g kg⁻¹: grama por quilograma
GP: glicoproteína
GPT: ganho de peso total
Hb: hemoglobina
HCM: hemoglobina corpuscular média
Ht: hematócrito
kg: quilograma
kg/dieta: quilograma na dieta
KOH: Hidróxido de Potássio
L: litro
μL: microlitro
LEUC: leucócitos totais
LINF: linfócitos
ln: logaritmo natural
M: manana
mg: miligrama
mg L⁻¹: miligrama por litro
mL: mililitro
mm: milímetro
MON: monócitos
MOS: mananoligossacarídeo
MPA: Ministério da Pesca e Aquicultura
MR: mannose receptor
NaCl: Cloreto de Sódio
NaOH: Hidróxido de Sódio
NBT: nitroblue tetrazolium
NEUT: neutrófilos
ng: nanograma
nm: nanômetro
PAMP: Pathogen Molecular Pattern

PBS: phosphate buffered saline

pg: picograma

pH: potencial hidrogeniônico

PRRs: Pathogen Recognition Receptors

PPT: proteínas plasmáticas totais

p v^{-1} : peso por volume

RBC: red blood cell

rpm: rotação por minuto

S: sobrevivência

TCE: taxa de crescimento específico

TEP: taxa de eficiência proteica

TLR-4: Toll-like receptor 4

TROMB: trombócitos totais

TSA: trypticase-soy agar

TSB: trypticase-soy broth

UFC mL^{-1} : unidade formadora de colônia por mililitro

VCM: volume corpuscular médio

vol.: volume

VP: Voges-Proskauer

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas.....	17
Tabela 2. Composição do ActiveMos®, segundo o fabricante.....	17
Tabela 3. Característica bioquímicas de <i>Lactococcus garvieae</i>	29
Tabela 4. Parâmetros imunológicos tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) após alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).....	31
Tabela 5. Contagem de trombócitos e leucócitos totais de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) após alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).....	34
Tabela 6. Contagem diferencial de leucócitos de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) após alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).....	35
Tabela 7. Parâmetros hematológicos de série vermelha de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com dieta suplementada com mananoligossacarídeo (MOS).....	39
Tabela 8. Índices hematimétricos de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).....	40
Tabela 9. Parâmetros bioquímicos de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) após alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).....	43
Tabela 10. Parâmetros de desempenho produtivo e coeficiente de digestibilidade aparente de proteína bruta de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) após 45 dias alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).....	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma da obtenção das frações glicana + manana (G+M), glicoproteína (GP), glicana insolúvel (GI); e manana (M) a partir da parede celular desengordurada (fonte: adaptado de CHAUD et al., 2007).....	8
Figura 2. Descrição básica de uma incubadora construída segundo o sistema de Guelph modificado (fonte: elaborada pelo autor).....	12
Figura 3. Ração experimental extrusada, finalizada para o fornecimento aos peixes.....	18
Figura 4. Curva padrão de lisozima. Cada ponto representa a ΔDO para cada concentração-teste de lisozima.....	20
Figura 5. Curva padrão de calibração para análise de sistema complemento. Leitura cinética da densidade óptica do “pool” das amostras de soro (—). Referência: cubeta sem soro (—)...	21
Figura 6. Ração peletizada acrescida de óxido de cromo III (Cr_2O_3).....	25
Figura 7. Incubadoras (80 L) adaptadas e dispostas ao lado das caixas experimentais (310 L) para coleta de fezes.....	26
Figura 8. Mortalidade de tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) após alimentação com mananoligossacarídeo (MOS) em distintos períodos e submissão a desafios com <i>Lactococcus garvieae</i>	51
Figura 9. Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) após desafio por co-habitação apresentando lesões hemorrágicas (setas) características da bactéria <i>Lactococcus garvieae</i> . Barra correspondente à 5,0 cm.....	53

**MANANOLIGOSSACARÍDEO NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*): AVALIAÇÃO DE INDICADORES IMUNOLÓGICOS E
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE DESEMPENHO PRODUTIVO.
RESPOSTA AO DESAFIO COM *Lactococcus garvieae***

RESUMO - Mananoligossacarídeo na alimentação pode melhorar a imunidade, crescimento e saúde de peixes cultivados. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de níveis de MOS ($0,0 \text{ g Kg}^{-1}$; $2,0 \text{ g kg}^{-1}$; $4,0 \text{ g kg}^{-1}$; $8,0 \text{ g kg}^{-1}$; $10,0 \text{ g kg}^{-1}$; $15,0 \text{ g kg}^{-1}$) na dieta de tilápia-do-Nilo sobre os parâmetros hematológicos e imunológicos, desempenho produtivo, digestibilidade de proteína e resistência à bactéria *L. garvieae*, após 45 dias. 576 tilápias ($127,3 \pm 4,79 \text{ g}$ e $18,7 \pm 0,27 \text{ cm}$), distribuídas em 24 caixas (310 L) com aeração e renovação constante de água (6 tratamentos e 4 repetições) foram alimentadas com as dietas-teste extrusadas. Aos 0, 7, 15, 30 e 45 dias após a alimentação, foi coletado sangue, destinado à realização de análises hematológicas e imunológicas. O consumo das dietas foi registrado semanalmente e aos 45 dias, os peixes foram pesados e medidos para obtenção de parâmetros de desempenho. Após 45 dias, as mesmas dietas, acrescidas de marcador e peletizadas foram oferecidas aos peixes e as fezes coletadas para determinar o coeficiente de digestibilidade de proteína. Nas mesmas condições, com 168 tilápias ($125,3 \pm 5,09 \text{ g}$ e $17,6 \pm 0,33 \text{ cm}$) e após 7, 15, 30 e 45 dias de alimentação realizaram-se desafios por co-habitação com *L. garvieae*, avaliando-se a taxa de mortalidade, durante 15 dias. Os grupos alimentados com o prebiótico não apresentaram melhora significativa em relação ao grupo controle nas variáveis imunológicas, hematológicas e digestibilidade de proteína. O mesmo ocorreu com o desafio bacteriano. Entretanto, a inclusão de $2,0$, $4,0$ e $8,0 \text{ g Kg}^{-1}$ de MOS na dieta melhorou os valores de ganho de pesos dos animais. Como conclusão, a inclusão de MOS não afetou a hematologia, imunidade, digestibilidade de proteína e resistência bacteriana. Mas, a inclusão de $2,0$, $4,0$ e $8,0 \text{ g Kg}^{-1}$ do prebiótico na dieta melhorou o ganho de peso da tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: Prebiótico, Imunologia, Hematologia, Parâmetros Zootécnicos, Desafio Bacteriano, Peixes

MANNAN OLIGOSACCHARIDE IN FEED OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*): EVALUATION IMMUNOLOGIC, HEMATOLOGICAL, BIOCHEMICAL INDICATORS AND OF PRODUCTION PERFORMANCE. RESPONDING TO THE CHALLENGE WITH *Lactococcus garvieae*

ABSTRACT - Mannan oligosaccharide in feed can improve immunity, growth and health of farmed fish. Thus, the objective of this study was evaluate the influence of MOS levels (0.0 g Kg⁻¹; 2.0 g kg⁻¹; 4.0 g kg⁻¹; 8.0 g kg⁻¹; 10.0 g kg⁻¹; 15.0 g kg⁻¹) in the diet of Nile Tilapia in hematological and immunological parameters, production performance, digestibility of protein and resisting bacteria *L. garvieae*, after 45 days. 576 tilapias (127.3 ± 4.79 g and 18.7 ± 0.27 cm), distributed in 24 fiberglass tank (310 L) with aeration and constant renewal of water (6 treatments and 4 replications) it was fed with diets-extruded test. In time 0, 7, 15, 30 and 45 days after feeding, it was collected blood for hematological and immunological analyses. The consumption of diets was registered weekly and in the period 45 days the fish was weighed and measured to obtain performance parameters. After 45 days, the same diets, added marker and pelletized, were offered to fish and the faeces was collected to determine protein digestibility coefficient. Under the same conditions, with 168 Nile tilapia (125.3 ± 5.09 g and 0.33 ± 17.6 cm) and after 7, 15, 30 and 45 days it was made challenges by cohabitation with *L. garvieae*, evaluating the mortality rate during 15 days. The groups fed with prebiotic didn't show significant improvement as compared to the control group on variables, immunological, hematological and protein digestibility. The same occurred with the bacterial challenge. However, the inclusion of 2.0, 4.0 and 8.0 g Kg⁻¹ of MOS in the diet improved the gain of weight of animals. As a conclusion, the inclusion of MOS not affected the hematology, immunity, protein digestibility and bacterial resistance. But, the inclusion of 2.0, 4.0 and 8.0 g Kg⁻¹ of the prebiotic on diet improved weight gain of Nile tilapia.

Keywords: Prebiotic, Immunology, Hematology, Zootechnical Parameters, Bacterial Challenge, Fish

1. INTRODUÇÃO

A tilápia-do-Nilo é a principal espécie de peixe produzida pela aquicultura brasileira, responsável por 46,6% da produção de pescado continental, com 253.824,1 toneladas (MPA, 2013). Esta espécie é bem aceita no mercado nacional e internacional, pois, além de ser tolerante ao manejo, apresenta crescimento rápido e conversão alimentar adequada (SCHWARZ et al., 2010). Todavia, com a intensificação da produção, surtos de doenças são frequentes, principalmente em altas temperaturas, comprometendo os resultados e causando prejuízos elevados.

Na tentativa de controlar essas doenças, os produtores utilizam, constantemente e sem critérios, um grande número de antimicrobianos que colocam em risco toda a cadeia produtiva, por deixar resíduos no pescado, comprometer a saúde dos peixes e o meio ambiente, além de provocar o aparecimento de cepas resistentes a esses medicamentos (LEVY; MARSHALL, 2004).

Assim, para minimizar perdas econômicas com mortalidade, deve-se buscar formas de elevar a resistência dos peixes às enfermidades. O uso de dietas suplementadas com ingredientes que podem influenciar benéficamente a imunidade, crescimento e a saúde de organismos cultivados, é uma estratégia promissora (SHEIKHOLESAMI-AMIRI et al., 2012).

Entre as substâncias utilizadas no manejo profilático na aquicultura está o mananoligossacarídeo (MOS), um prebiótico, extraído da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, constituída de cerca de 40% de β -glucanos, 40% de α -mananas, 28% de proteínas, 7% de lipídeos, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina (HOUGH, 1990) e que pode influenciar a saúde e o desempenho zootécnico do animal, com ação preventiva na colonização intestinal de bactérias patogênicas e ação estimulante do sistema imunológico (OYOFO et al., 1989; STAYKOV; DENEV; SPRING, 2005; CULJAK et al., 2006; STAYKOV et al., 2007). A manose, presente no MOS, é considerada um padrão molecular associado a patógenos (PAMP - Pathogen Molecular Pattern), reconhecida por células do sistema imune, por meio de seus receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs - Pathogen recognition receptors), capacitando a modulação da imunidade inata, com produção e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (WILLMENT;

BROWN, 2007). Agentes patogênicos e toxinas, que ligam-se ao MOS, podem ser identificados de maneira mais fácil pelo sistema imunológico (LAUE; TUCKER, 2006) e, conseqüentemente, combatidos. Pesquisas sobre a resistência a agentes patogênicos e resposta imunológica com alimentação contendo imunoestimulantes são importantes, e deve-se observar o tempo de administração, regime de alimentação e a dosagem nas dietas para cada espécie de peixe (SAKAI, 1999). Além de importante, a utilização de MOS na aquicultura é caracterizada por variados resultados (com efeitos ou não) entre níveis e espécies.

A efetividade de uma ração utilizada, principalmente quando se quer avaliar a influência de determinados ingredientes, pode ser creditada por meio da análise de digestibilidade dos componentes presentes na dieta. Os resultados de digestibilidade dos nutrientes em uma dieta permitem demonstrar o aproveitamento dos mesmos, se há excesso principalmente proteico, podendo, ainda, mostrar e evitar maiores custos produtivos e dietas ineficientes que podem afetar negativamente o crescimento e desempenho produtivo de peixes (GONÇALVES; CARNEIRO, 2003).

Doenças principalmente de origem bacteriana constituem-se como um importante problema na piscicultura intensiva, devido à característica oportunista e a facilidade de disseminação (KUBTIZA, 2000; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). Encontradas frequentemente, *Streptococcus* spp.; *Aeromonas* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Flavobacterium columnare* (KUBTIZA; KUBTIZA, 2004); *Edwardsiella tarda*; *Vibrio anguillarum* e *Enterococcus* sp. (MORAES; MARTINS, 2004) são apontadas como os principais agentes patogênicos causadores de perdas na produção comercial de peixes.

Com relação à *Lactococcus garvieae*, esta bactéria é considerada um agente patogênico oportunista de baixa virulência, porém altamente infeccioso para animais imunocomprometidos (RUOFF; WHILEY; BEIGHTON, 1999), atingindo peixes de grande importância como truta arco-íris (CHANG; LIN; LEE, 2002; PEREIRA et al., 2004;) e várias outras espécies de peixes ao redor do mundo (VENDRELL et al., 2006).

Evans, Klesius e Shoemaker (2009) encontraram, pela primeira vez, evidências da presença de *Lactococcus garvieae* em tilápia (*Oreochromis niloticus*)

no Brasil. Porém, desde então, há carência de trabalhos com a utilização deste patógeno em tilápia no país.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da inclusão dietária de mananoligossacarídeo (MOS) sobre respostas imunológicas, hematológicas, bioquímicas, de desempenho produtivo, digestibilidade de proteína e resistência de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) à bactéria *Lactococcus garvieae* após 45 dias de alimentação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Tilápia

A tilápia é uma espécie originária da África, Israel e Jordânia, introduzida no país, no nordeste brasileiro, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS (FREITAS; GURGEL, 1984).

Há três gêneros que compreendem as espécies de nome comum tilápia: *Oreochromis* (tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, tilápia de Moçambique, *O. mossambicus*, tilápia azul, *O. aureus*, e *O. uroleps hornorum*) (KUBITZA, 2000; WATANABE et al., 2002). Além deste gênero há também os gêneros *Sarotherodon*, e *Tilapia* (POPMA; MASSER, 1999; WATANABE et al., 2002).

A tilápia está distribuída em águas quentes subtropicais entre 20 e 30 °C, cultivadas em água doce, estuarina ou salobra (MEURER; HAYASHI; BOSCOLO, 2003). Em sistema de cultivo em águas continentais, em termos de produção só é inferior à carpa (YASUI et al., 2007).

A Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), família Cichlidae, subfamília Tilapiinae, tribo Tilapiini, possui dentre outras características, corpo alto e curto, listras verticais de coloração metálica na nadadeira caudal, cabeça pequena que, quando alevinos, apresenta tom metálico verde-azulado (GALLI; TORLONI, 1986). Naturalmente considerada onívora, herbívora e/ou fitoplantofaga, alimenta-se de plâncton, organismos bentônicos, invertebrados aquáticos, matéria orgânica em decomposição, folhas, larvas de peixes e detritos (HUET, 1973). Adapta-se bem nutricionalmente em condições de cultivo (CARVALHO; FORESTI, 1996), tendo boa aceitação de dietas artificiais.

O cultivo desta espécie é altamente difundido mundialmente, inclusive no Brasil, onde, tem uma produção de 46,6% em todo continente, com 253.824,1 toneladas (MPA, 2013). Características do produto final como carne branca saborosa, sem espinhas em forma de “Y”, com textura firme e filé de fácil processamento (JORY; ALCESTE; CABRERA, 2000; FURUYA et al., 2003) fazem esta espécie ser bem aceita no mercado. Além disso, apresenta alta taxa de crescimento (HASSANIEN et al., 2004), conversão alimentar adequada (KUBITZA,

2000; SCHWARZ et al., 2010), resistência à enfermidades (PLUMB, 1997; ARDJOSOEDIRO; RAMNARINE, 2002; ZANIBONI FILHO, 2004), à baixos teores de oxigênio dissolvido (EL-SAYED; KAWANNA, 2004) e à alta densidade populacional (GALL; BAKAR, 1999).

2.2. Componentes Imunológicos em Peixes

Devido a não possuírem medula óssea e linfonodos, em peixes, os tecidos mielóides e linfóides como o rim cefálico podem apresentar função imuno-endócrina (TORT et al., 2003). Este órgão realiza um papel que equivale ao da medula óssea nos vertebrados superiores, como órgão hematopoiético (ZAPATA; CHIBA; VARAS, 1996). Os leucócitos produzidos no timo, rim cefálico e baço podem ser considerados como os principais componentes imunológicos em peixes (HRUBEC; SMITH, 2000; TORT; BALASHI; MACKENZIE, 2003). O sistema imune específico em peixes é mais lento comparado aos mamíferos, principalmente em condições onde a temperatura da água é inferior à sua zona de conforto (BLY; CLEM, 1994). Acredita-se que, para os peixes, as respostas inatas tenham mais expressão (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

A fagocitose, caracterizada pelo processo de englobamento do antígeno, realizado para sua destruição, é a principal característica dos fagócitos. Uma vez dentro do denominado fagossomo (vacúolo), ocorrem atividades antimicrobianas que consequentemente matam e digerem o agente agressor (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1998). Neste processo, há aumento do consumo de oxigênio molecular, conhecido como *burst* respiratório. O complexo NAPH oxidase é ativado, catalisando a produção de espécies reativas (SASSADA; PABST; JOHNSTON, 1983). As espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido, hidroxila e outras agem como agentes oxidantes ou são convertidos em radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CADENAS; CADENAS, 2002). Os leucócitos granulares, então, liberam uma enzima chamada mieloperoxidase que transforma o peróxido de hidrogênio em hipoclorito o que produz as cloraminas, que são substâncias conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais oxidam os microorganismos e ajudam na destruição. A produção de EROs pode ser mensurada

pela redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT). Este atua na captação de elétrons do superóxido e ocorre sua redução. Posteriormente, devido à esta ação, são formados precipitados de material insolúvel azul escuro no interior do fagócito, os denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1990).

Além da ação fagocitária, importantíssima durante o processo de defesa, os leucócitos são os principais produtores de um componente imunológico bastante efetivo em peixes, a lisozima. A lisozima nos peixes é considerada um eficaz agente bacteriolítico (LIE et al., 1989). Em uma infecção age sobre as ligações $\beta(1-4)$ glicosídicas dos ácidos N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamínico da parede celular bacteriana (PAULSEN et al., 2003). A atividade desta enzima também já foi descrita nas brânquias, ovos e ovário (SANKARAN; GURNANI, 1972; LIE et al., 1989; TAKEMURA; TAKANO, 1995). A determinação da lisozima pode ajudar a diagnosticar a imunidade e resistência a doenças (SAURABH; SAHOO, 2008).

Outro mecanismo considerado muito eficaz em peixes é a ação das proteínas do sistema complemento. Há cerca de 35 proteínas. Semelhantes às encontradas em mamíferos, as várias proteínas do sistema complemento de peixes, tem a característica de possuir diversas formas, aumentando o reconhecimento durante um ataque (HOLLAND; LAMBRIS, 2002). O sistema complemento é caracterizado por duas vias, clássica e alternativa. A clássica é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo e imunoglobulinas, a alternativa é ativada por bactérias, fungos, vírus e helmintos. Em peixes, a ação antibacteriana é devida principalmente à ativação da via alternativa (KOPPENHEFFER, 1987). As proteínas do sistema complemento participam de processos imunitários como na fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas bacterianas (SECOMBES, 1996).

2.3. Mananoligossacarídeo

O mananoligossacarídeo (MOS) resiste às degradações enzimática e bacteriana intestinais. Ingredientes alimentares não digeríveis no trato gastrointestinal, chamados de prebióticos, beneficiam o hospedeiro, estimulando, seletivamente, o crescimento e/ou atividade de determinados microrganismos no

cólon, proporcionando um intestino saudável (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Assim, também é denominado o mananoligossacarídeo, um prebiótico.

A biomassa de levedura (*Saccharomyces* sp.) é obtida no Brasil pelo setor sucroalcooleiro, na fermentação, como subproduto da produção de etanol, com produção estimada de 240 mil toneladas por ano; na produção de cerveja, com cerca de 35.000 toneladas por ano e pelo o setor de panificação, com produção de 120 mil toneladas por ano (FURCO, 1996; PEIXOTO, 1996 citado por CHAUD et al., 2007). Na obtenção do MOS, a parede celular da levedura é separada dos componentes intracelulares e o líquido contendo MOS é evaporado à baixa temperatura (*spray dry*) para não danificar sua funcionalidade (SPRING et al., 2000). α -D-mananos, através de interações com células imunológicas, são capazes modular o sistema imune de diversos organismos vivos (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Por isso, também, o MOS é considerado um imunoestimulante.

Os componentes funcionais da parede celular da levedura são a glicana, glicoproteínas e a manana (que origina o mananoligossacarídeo). Os mesmos podem ser obtidos por processos químicos, a exemplo a metodologia sugerida por Otero et al. (1996) citada e utilizada por Chaud et al. (2007) a partir da parede celular desengordurada (Figura 1).

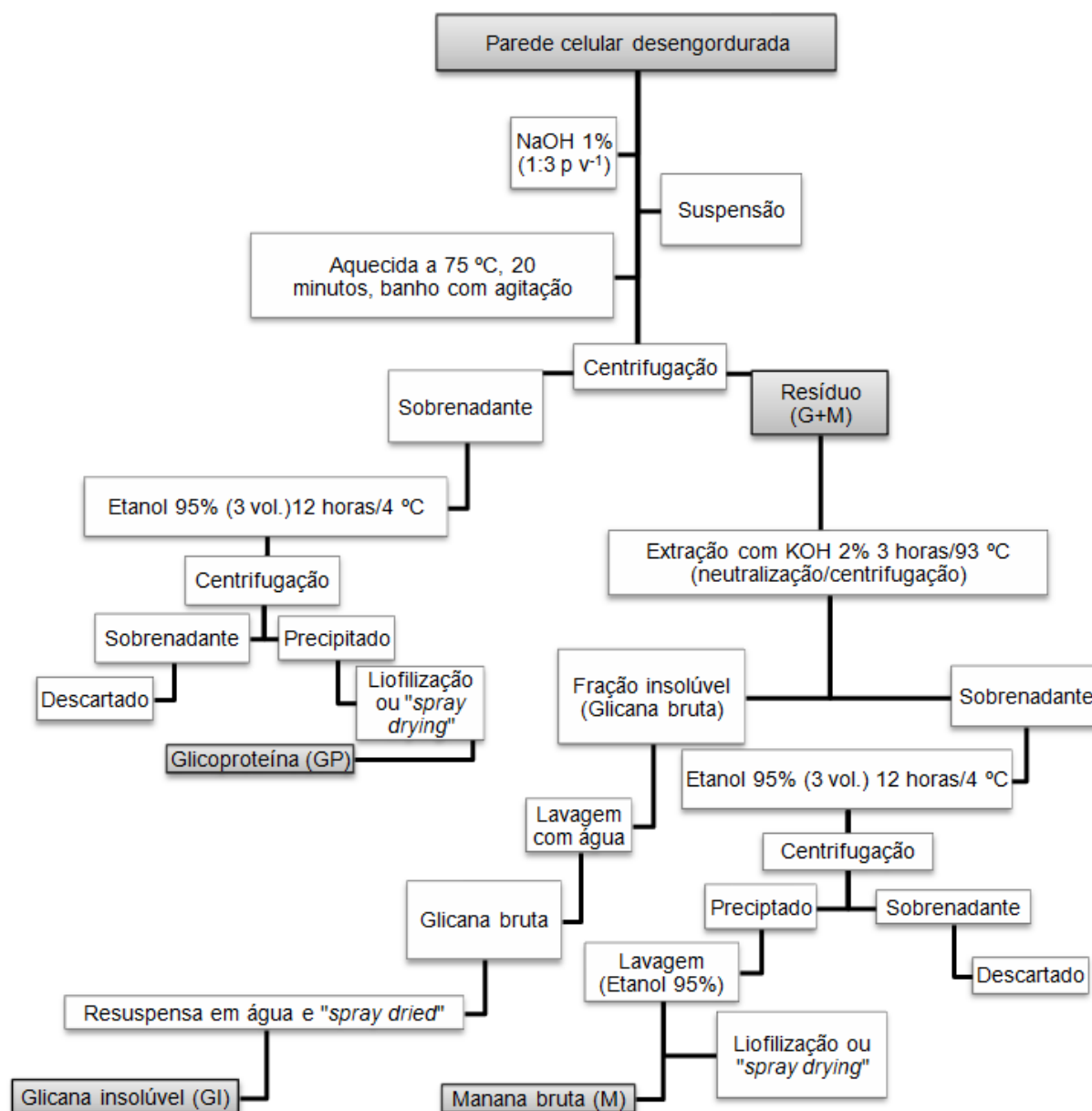


Figura 1. Fluxograma da obtenção das frações glicana + manana (G+M), glicoproteína (GP), glicana insolúvel (GI); e manana (M) a partir da parede celular desengordurada (fonte: adaptado de CHAUD et al., 2007).

Bactérias patogênicas intestinais que possuem lectinas ligantes de manose podem colonizar e infectar o epitélio superficial do intestino (BAUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 1997). Ao ligar-se com estes receptores de bactérias como *E.coli* e *Salmonella* spp., as α -D-mananas previnem a superfície do vilo e consequentemente colonização intestinal e disseminação bacteriana patogênica (FIRON; OFEK; SHARON, 1983). O mananoligossacarídeo ao recobrir o epitélio da superfície das

células intestinais (enterócitos), ocupa os sítios de ligação e as fimbrias bacterianas aderem-se a ele no lugar das células epiteliais (PELICANO; SOUZA; SOUZA, 2002). Também podem agir como prebiótico pelo aumento na produção de ácido láctico, aumento de bactérias benéficas e melhoramento da imunidade (SAVAGE; COTTER; ZAKRZEWSKA, 1996).

Através de receptores de reconhecimento de patógenos específicos de células imunitárias, a manose presente no MOS, considerada um padrão molecular associado a patógenos, é reconhecida em especificidade. Estes receptores são mencionados em mamíferos, colectinas, Dectina-2 e o ligante-I-CAM-3 não integrina específico de células dendríticas (DC-SIGN), Toll-like receptor 4 (TLR-4), receptor de manose (MR) (WILLMENT; BROWN, 2007). Cada um destes realiza funções que estimulam, modulam e/ou auxiliam o sistema imunológico em sua efetiva ação de defesa. Em peixes são muito pouco os estudos descritivos sobre tais receptores específicos de manose. Porém, como há resultados positivos sobre o sistema imunológico com a utilização do mananoligossacarídeo, acredita-se que funções, neste sentido, possam ocorrer.

Em juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*) alimentados com dieta com 6,0 g kg⁻¹ de mananoligossacarídeo, por 46 dias, obtiveram maior crescimento, absorção de proteínas e taxa de sobrevivência, em relação ao grupo controle (CULJAK et al., 2004). O MOS também foi recomendado como um prebiótico influente na conversão alimentar, eficiência proteica e aumento da altura das vilosidades intestinais de juvenis e larvas de tilápia-do-Nilo, ao nível de 10,0 g kg⁻¹ e 3,4 g kg⁻¹ na dieta, respectivamente (SCHWARZ et al., 2010; SCHWARZ et al., 2011). A inclusão de 3,0 g kg⁻¹ de mananoligossacarídeo na ração melhorou o fator de condição, a taxa de crescimento específico e a taxa de conversão alimentar de esturjão do Golfo (*Ancipenser oxyrinchus*) (PRYOR et al., 2003).

Além da melhora em parâmetros de sobrevivência, desempenho produtivo e integridades das vilosidades, o MOS também está relacionado com uma maior estimulação do sistema imunológico em peixes, como alteração positiva na produção de anticorpos, atividade bacteriolítica, atividade de lisozima e sistema complemento e/ou atividade respiratória de leucócitos em truta arco-íris (STAYKOV et al., 2007), carpa comum (STAYKOV; DENEV; SPRING, 2005), robalo europeu

(TORRECILLAS et al., 2007), *Sciaenops ocellatus* (ZHOU; BUENTELLO; GATLIN III, 2010) e rohu (*Labeo rohita*) (ANDREWS et al., 2009).

A dosagem e a forma de administração do mananoligossacarídeo que proporcione benefícios em peixes, ainda não estão bem elucidadas. Pois, resultados contraditórios foram descritos em diversas espécies, dentre elas em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (WELKER et al., 2007), *Sciaenops ocellatus* (ZHOU; BUENTELLO; GATLIN III, 2010), esturjão (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) (PRYOR et al., 2003) e salmão (*Salmo salar*) (GRISDALE-HELLAND; HELLAND; GLATIN III, 2008).

2.4. Digestibilidade

A capacidade de ingestão e absorção, associado ao conteúdo nutricional de um alimento define o valor nutritivo do mesmo (HIGUERA, 1987). Os resultados de digestibilidade dos nutrientes em uma dieta permitem demonstrar realmente se houve aproveitamento dos mesmos, se há excesso principalmente proteico, podendo, ainda, mostrar e evitar maiores custos produtivos e dietas ineficientes e desbalanceadas, que podem afetar negativamente o crescimento e desempenho produtivo de peixes (GONÇALVES; CARNEIRO, 2003).

O conhecimento da digestibilidade de nutrientes em animais é altamente importante para suprir as exigências nutricionais de determinada espécie, pois, somente saber os hábitos alimentares e aplicar dietas nutricionalmente equilibradas não asseguram resultados positivos em relação ao desempenho (SOUZA, 1989). A digestibilidade de um determinado nutriente ou energia representa a fração destes no alimento que não é excretada nas fezes (NRC, 1993).

O aproveitamento do alimento varia com a espécie, essa diferença é determinada pelo coeficiente de digestibilidade, representado pela habilidade do animal em digerir nutrientes e energia presentes no alimento (ANDRIGUETO, 1999).

Como a metodologia de coleta é dificultada, pois, a urina e excretas das brânquias são solúveis em água, para determinar a digestibilidade aparente de dietas fornecidas à peixes, utiliza-se a coleta de fezes após fornecimento de dietas com marcadores (AUSTRENG, 1978).

Os marcadores em fezes são divididos em dois grupos: internos e externos. Os externos devem ser aplicados à dieta ou por outra via ao animal, e os marcadores internos são encontrados de maneira natural nos alimentos (KOTB; LUKEY, 1972). Esses marcadores devem ter como características: serem indigestíveis e não absorvíveis, ter ausência de função farmacológica no aparelho digestório, passar pelo mesmo de maneira uniforme e apresentar rapidez e facilidade na determinação química (MAYNARD; LOOSLY, 1966).

Há técnicas adaptadas para coleta total de fezes, como câmara metabólica, sistema de filtragem contínua de fezes (HALVER, 1989) e sistema de bolsa coletora de fezes (VIDAL JÚNIOR, 2000), sucção ou dissecação na porção final do intestino e extrusão manual. Mas a coleta parcial de fezes, com a utilização de marcadores na dieta é mais utilizada e tem maior precisão.

No estudo da digestibilidade em peixes com o uso de marcador, o óxido de cromo III (Cr_2O_3) é o mais utilizado. Esta técnica apresenta vantagens na substituição da coleta total de fezes, por ser economicamente viável e ser exercida com tempo reduzido (KANE; JACOBSON; DAMEWOOD, 1959). O óxido de cromo III tem coloração de verde clara à escura, é insolúvel em água, álcool ou acetona, porém, ligeiramente solúvel em ácidos e álcalis (THE MERK INDEX, 1966).

Após alimentação dos animais com a dieta contendo o marcador, as fezes devem ser coletadas. O sistema mais utilizado para a coleta de fezes em peixes é o chamado sistema de Guelph modificado (GONÇALVES, 1998). Neste sistema, o fluxo de água é constante, na extremidade inferior cônica (em declínio) de incubadoras são fixados registros, que permitem a regulação do fluxo e a acoplagem de um tubo de ensaio, para a deposição das fezes excretadas pelos peixes incubados (Figura 2).

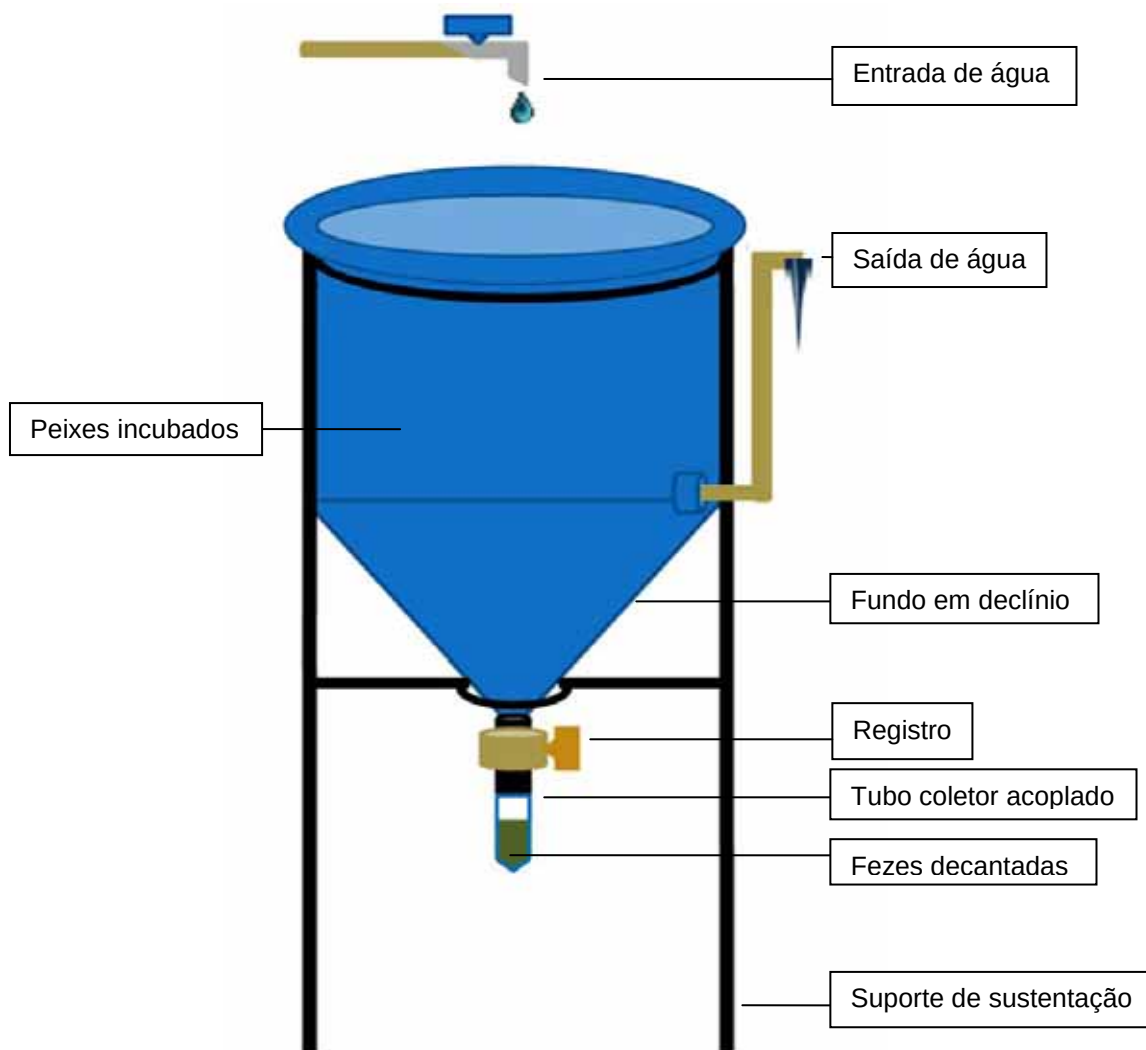


Figura 2. Descrição básica de uma incubadora construída segundo o sistema de Guelph modificado (fonte: elaborada pelo autor).

2.5. *Lactococcus garvieae*

A *L. garvieae* é uma bactéria não-móvel, estruturalmente apresentada como cocos ovóides em pares ou em pequenas cadeias, não forma esporos, é anaeróbia facultativa, Gram-positiva e em condições de cultivo em ágar sangue, produz α -hemólise. Apresenta bom crescimento em meios contendo 6,5% cloreto de sódio (NaCl) (pH de 9,6) com 40 % de bÍlis e em 0,1% de azul de metileno de leite, em condições de 4 a 45°C, mas sua temperatura ideal é de 37°C durante 24 horas e em 4°C pode crescer entre 12 e 15 dias (KUSUDA et al.,1991; PRIETA et al., 1993; ELDAR et al., 1996). Seu crescimento é considerado bom em meios de cultura como

ágar BHI, ágar TSA, caldo TSB e ágar BEA, mas não apresenta crescimento em ágar McConkey e ágar para *Enterococcus* (TORANZO et al., 1994). Pode crescer também em caldo BHIB (CHENG; CHEN, 1999).

A Streptococose, septicemia causada por bactérias (cocos) Gram-positivas, foi descrita, primeiramente, no continente asiático, especificamente no Japão, em cultivo intensivo de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), no final dos anos 50 (HOSHINA; SANO; MORIMOTO, 1958).

Inicialmente descrito como *Streptococcus garvieae*, *L. garvieae* foi descrita, em um estudo de mastite bovina na Grã-Bretanha (COLLINS et al., 1983). A septicemia causada por *Lactococcus garvieae*, chamada de Lactococose é um tipo de Streptococose, que tem grande impacto na criação de salmonídeos de água doce e na marinocultura (VENDRELL et al., 2006).

Em 1985, ocorreu a divisão entre os gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus*, ambos pertencentes, ainda, à família Streptococcaceae (SCHLEIFER et al., 1985). Dentro do gênero *Lactococcus* destacam-se, com importância patogênica humana e animal, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *latis* e *L. garvieae* (AGUIRRE; COLLINS, 1993; ANTOLÍN et al., 2004).

Os sinais clínicos da doença são anorexia, melanose, letargia e natação errática. Externamente, exoftalmia (uni ou bilateral), hemorragias na região periorbital e intra-ocular, no opérculo e região bucal, na base das nadadeiras e região perianal, escurecimento da pele. Ascite e propulsão anal também são sinais descritos (PRIETA et al., 1993; ELDAR; GHITTINO, 1999; MÚZQUIZ et al., 1999; VENDRELL et al., 2007). Internamente, o peixe pode apresentar hemorragia na cavidade peritoneal, além de exsudato purulento (DOMÉNECH et al., 1993; AFONSO; SILVA; GOMES, 2003).

São registrados surtos em trutas arco-íris por vários países em diferentes continentes, na Inglaterra, África do Sul, países da região do Mediterrâneo, Austrália, Japão e Taiwan (VENDRELL et al., 2006). Comprometendo cerca de 50-80 % da produção total (GHITTINO; PREARO, 1992). *L. garvieae* além de causar mortalidade (até 50 %), diminui a taxa de crescimento e torna os peixes não comercializáveis (VENDRELL et al., 2006). Não somente em truta arco-íris, mas o isolamento deste patógeno já foi descrito em catfish (*Ictalurus punctatus*) (RAVELO et al., 2003),

enguia japonesa (*Anguilla japonica*) (KUSUDA et al.,1991), linguado (*Paralichthys olivaceous*) (LEE et al., 2001), tainha (*Mugil cephalus*) (CHEN et al., 2002), e dentre outros, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2009). Desde então, em tilápia-do-Nilo, não são encontrados trabalhos com este agente patogênico no país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de mananoligossacarídeo (MOS) incorporados à dieta na modulação das respostas imunológicas, hematológicas e bioquímicas, no desempenho produtivo e digestibilidade de proteína de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após 45 dias de alimentação e sobrevivência após desafio por co-habitação com a bactéria *Lactococcus garvieae*;

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se ocorrem efeitos com suplementação de 0,0, 2,0, 4,0, 8,0, 10,0 e 15,0 g kg⁻¹ do prebiótico nas respostas imunológicas, hematológicas e bioquímicas da tilápia após 0, 7, 15, 30 e 45 dias de alimentação;
- Comparar o desempenho zootécnico de *Oreochromis niloticus* alimentados com dietas suplementadas com os diferentes níveis do prebiótico, após 45 dias;
- Determinar os coeficientes de digestibilidade de proteína após 45 dias de alimentação com as dietas contendo os níveis de mananoligossacarídeo;
- Avaliar a sobrevivência da tilápia-do-Nilo alimentada com os níveis de MOS na dieta, após desafios por co-habitação com a bactéria *Lactococcus garvieae* nos períodos de 7, 15, 30 e 45 dias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de Realização do Experimento

O experimento foi conduzido no biotério do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP de Jaboticabal - SP (21.15 S / 48.17 W).

4.2. Condições e Dietas

Os peixes foram adquiridos de piscicultura comercial. Após pesados e medidos, foram distribuídos aleatoriamente em 24 caixas com capacidade para 310 litros (seis tratamentos, quatro repetições), com aeração e renovação constante de água.

Durante o período de aclimação (30 dias), os peixes foram alimentados diariamente com uma dieta comercial (Fri-Aqua 32®, Nutreco), isenta de MOS.

As dietas experimentais (Tabela 1) foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais para tilápias em crescimento (NRC, 1993). Os níveis de MOS (0,0, 2,0, 4,0, 8,0, 10,0 e 15,0 g kg⁻¹) (ActiveMos® - Biorigin, Lençóis Paulista, São Paulo, Brasil – Tabela 2) foram incluídos nas dietas em substituição aos níveis de Caulim (0,0, 5,0, 7,0, 11,0, 13,0 e 15,0 g kg⁻¹), um ingrediente nutricionalmente inerte. Os ingredientes foram pesados, inicialmente, misturados em misturador horizontal e triturados, misturados em misturador “Y” e triturados novamente. As dietas foram extrusadas na medida de 3 a 4 mm de diâmetro (Figura 3) e secas, sendo estocadas a - 20 °C até o momento da utilização. Cada unidade experimental possuía seu respectivo recipiente identificado contendo a dieta, sendo preenchido de acordo com a necessidade.

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas.

Ingredientes (%)	Dietas					
	Controle	2,0 g kg ⁻¹	4,0 g kg ⁻¹	8,0 g kg ⁻¹	10,0 g kg ⁻¹	15,0 g kg ⁻¹
Farinha de peixe	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7
Farelo de soja	35,6	35,6	35,6	35,6	35,6	35,6
Farelo de milho (fubá)	19,0	19,0	19,0	19,0	19,0	19,0
Farelo de trigo	15,2	15,2	15,2	15,2	15,2	15,2
Quirera de arroz	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
Óleo de soja	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
Fosfato bicálcico	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Calcário	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Vitaminas e minerais ¹	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-metionina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Caulim	1,5	1,3	1,1	0,7	0,5	0,0
Mananoligossacarídeo	0,0	0,2	0,4	0,8	1,0	1,5
Composição nutricional (%)						
Umidade	3,40	3,20	4,32	3,40	3,30	2,89
Extrato etéreo	3,61	3,85	3,93	3,66	3,91	4,05
Proteína bruta	29,06	30,33	30,46	30,58	31,09	31,27
Fibra bruta	4,59	4,67	5,10	4,64	4,69	5,35
Matéria mineral	12,38	11,75	11,04	10,83	13,14	10,04

¹ Premix vitamínico e mineral (kg/dieta): ácido fólico, 1,0 mg; ácido pantotênico, 20 mg; antioxidante, 125 mg; colina, 150 mg; cobre, 25 mg; ferro, 62,5 mg; iodo, 1,25 mg; manganês, 62,5 mg; zinco, 100 mg; selênio, 0,25 mg; vitamina A, 9000 UI; vitamina B1, 20,25 mg; vitamina B12, 20,25 mg; vitamina B2, 20,25 mg; vitamina B6, 20,25 mg; vitamina C, 300 mg; vitamina D3, 3150 UI; vitamina E, 60 UI; vitamina K, 9 mg; niacina, 100 mg; biotina, 0,1 mg.

Tabela 2. Composição do ActiveMos®, segundo o fabricante.

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



Figura 3. Ração experimental extrusada, finalizada para o fornecimento aos peixes.

Os peixes foram alimentados “ad libitum” (até a saciedade aparente), três vezes ao dia (09:00, 13:00 e 17:00 horas), durante 45 dias. As dietas, primeiramente, nos horários estabelecidos, eram fornecidas de maneira e quantidade iguais para os peixes de todas as caixas. Quando não ocorria mais o consumo, existindo excedente de ração, o fornecimento era cessado e os grupos em que a dieta era totalmente consumida, eram novamente arraçoados em quantidades iguais, com uma medida menor, quando necessário, sucessivamente. No momento que não havia mais consumo pelos peixes, o excesso de ração era retirado para evitar impurezas na água.

Tanto no período de aclimação como nos períodos experimentais, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados.

No primeiro período experimental (avaliação, imunológica, hematológica, bioquímica e de desempenho produtivo e digestibilidade de proteína) a temperatura da água foi de $28,8 \pm 1,2$ °C, oxigênio dissolvido foi $4,36 \pm 1,1$ mg L⁻¹, pH foi $7,6 \pm 0,23$, nitrito foi 0,1 mg L⁻¹, nitrato foi 10 mg L⁻¹, alcalinidade foi 150 ± 50 mg L⁻¹, e amônia

total foi indetectável. No segundo período experimental, para determinação da sobrevivência após o desafio bacteriano, a temperatura da água foi de $27,5 \pm 1,6$ °C, oxigênio dissolvido foi $4,49 \pm 2,3$ mg L⁻¹, pH foi $7,4 \pm 0,51$, nitrito foi 0,1 mg L⁻¹, nitrato foi 10 mg L⁻¹, alcalinidade foi 150 ± 30 mg L⁻¹, e amônia total foi indetectável.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 02981/14) e está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.3. Avaliação Imunológica, Hematológica e Bioquímica

4.3.1. Amostragens

Um total de 576 peixes ($127,3 \pm 4,79$ g e $18,7 \pm 0,27$ cm) foi utilizado neste estudo, pesados, distribuídos 24 animais para cada caixa e amostrados nos dias 0, 7, 15, 30 e 45 dias após o fornecimento das dietas experimentais. Em cada amostragem, oito peixes de cada tratamento foram anestesiados (benzocaína, 0,1 g L⁻¹) e submetidos à coleta de sangue (3,0 mL) por punção de vaso caudal. Alíquotas de aproximadamente 0,3 mL foram distribuídas em tubos de polietileno (1,5 mL), contendo 15 µL de heparina sódica, destinado às análises hematológicas e atividade respiratória de leucócitos. Uma gota de sangue não heparinizado foi destinada à confecção de extensões sanguíneas. O sangue excedente foi colocado em tubos de vidro não heparinizados e deixado para coagular por 45 minutos em temperatura ambiente. Após esse procedimento, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 minutos a 4 °C, e o soro distribuído em tubos plásticos de 1,5 mL e armazenado a -70 °C.

4.3.2. Imunologia Inata

A análise da atividade respiratória dos leucócitos (“Burst” oxidativo) foi mensurada segundo protocolo de Anderson e Siwichi (1995) modificado por Biller-Takahashi et al. (2013). 100 µL de sangue contendo anticoagulante foram

adicionados em 100 µL de tampão fosfato (pH 8,4) contendo nitroazul de tetrazolium (NBT) (Sigma, St. Louis, MO, USA), na proporção de uma pastilha para cada 5 mL de tampão. Após incubação por 30 minutos, 50 µL desta solução foi adicionada a 1,0 mL de N,N-dimetilformamida, agitado, centrifugado a 450 rpm por 5 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro (absorbância à 540 nm).

Determinou-se a concentração de lisozima sérica, utilizando o soro dos animais, com base na metodologia de Smolelis e Hartsell (1949) pela lise da bactéria *Micrococcus lysodeikticus* mensurada em densidade óptica (540 nm). Foi realizado o ensaio turbidimétrico segundo Ellis (1990), modificado por Marzocchi-Machado et al (1999) e Abreu et al. (2009), em leitor de ELISA no início da reação e após 5 e 10 minutos e obtidos os valores por cálculo em curva padrão (Figura 4).

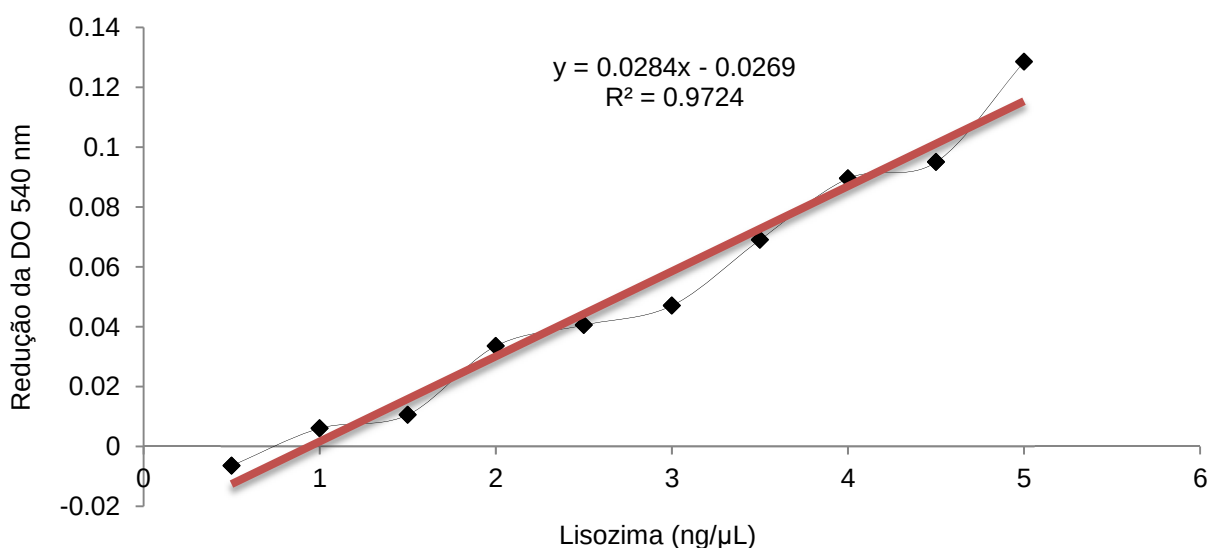


Figura 4. Curva padrão de lisozima. Cada ponto representa a ΔDO para cada concentração-teste de lisozima.

A atividade de complemento foi realizada de acordo com Polhill et al. (1978), adaptado por Biller-Takahashi et al. (2012), usando hemácias de coelho, avaliando 50% de hemólise em função do tempo. 60 µL de amostra de soro e 140 µL de tampão (TEA-EGTA 8 mM e Mg^{2+} 2 mM, com gelatina 0,1%, na proporção de 1:10) foram pipetados em cubeta (capacidade de 1mL) e em seguida adicionados 400 µL da suspensão preparada de hemácias e realizada a espectrofotometria cinética (à 700 nm) (Figura 5).

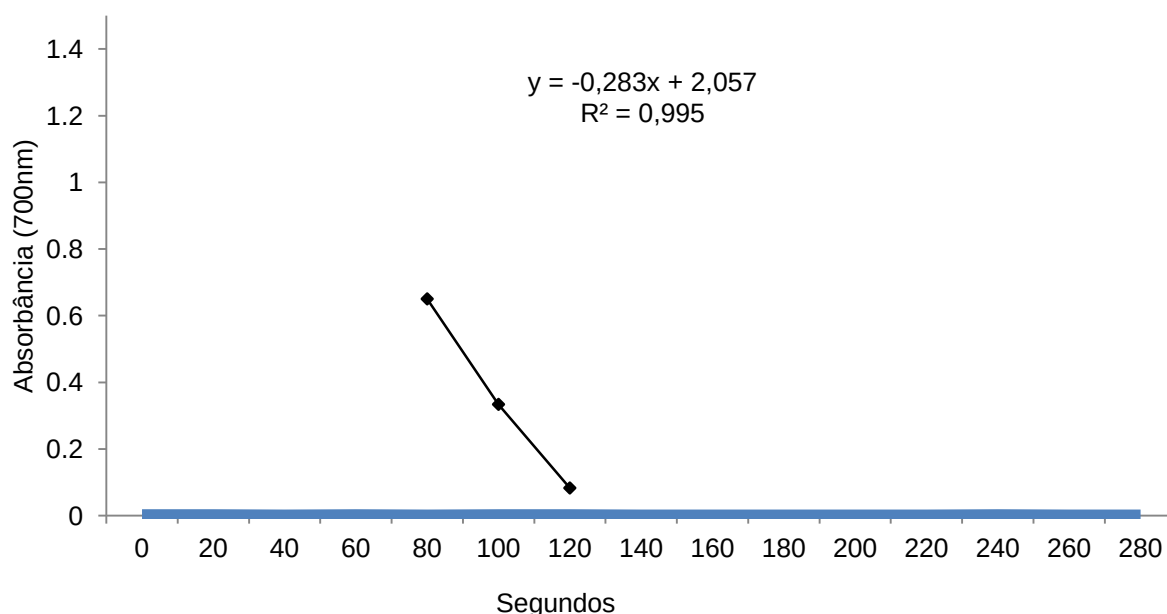


Figura 5. Curva padrão de calibração para análise de sistema complemento. Leitura cinética da densidade óptica do “pool” das amostras de soro (—). Referência: cubeta sem soro (—).

4.3.3. Hematologia

As extensões sanguíneas foram coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright (ROSENFELD, 1947), para posterior contagem total de trombócitos e leucócitos totais e contagem diferencial dos leucócitos (HRUBEC; SMITH, 1998). A coloração das extensões foi realizada na relação 4/14 minutos (4 minutos banhadas no corante e 14 minutos em água destilada).

As contagens foram realizadas em microscopia de luz no aumento de 1000x com o auxílio de óleo de imersão. Dentre 2000 células totais contadas (eritrócitos, leucócitos e trombócitos), foram obtidos os valores de leucócitos totais (LEUC) e trombócitos totais (TROMB). Também foram contados em seguida 200 leucócitos e mensurados os valores de monócitos (MON), linfócitos (LINF), basófilos (BAS), eosinófilos (EOS) e neutrófilos (NEUT). Todos dados foram expressos em células por microlitro (10^3 células μL^{-1}).

Utilizando o sangue heparinizado, foram determinados os dados das variáveis de série vermelha:

- Hematócrito (Ht): pela técnica de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) com o uso de tubos capilares e régua padrão. Os valores foram mensurados seguidos da coleta de sangue. Nesta análise, foram preenchidos tubos capilares e os mesmos foram centrifugados (12.500 rpm por 5 minutos). Após a centrifugação, os eritrócitos são separados em relação aos demais componentes circulantes do sangue total e calculados por meio de cartão padrão. O resultado obtido é proporcional à porcentagem de células vermelhas no sangue total;
- Taxa de hemoglobina (Hb): pelo método de cianometahemoglobina (COLLIER, 1944) em ensaio colorimétrico. A análise foi realizada simultaneamente à coleta do sangue. 2,5 mL de solução de cianeto de potássio (reagente Drabkin) foram pipetados em tubo de ensaio e em seguida adicionados 15 μL de sangue. Após a homogeneização, a amostra foi colocada em banho-maria (15 minutos), realizada a centrifugação (3.500 rpm por 5 minutos) e o conteúdo foi colocado em cubeta de cristal para análise de absorbância (540 nm). O resultado foi expresso em gramas por decilitro (g dL^{-1}).
- Contagem de eritrócitos (RBC): em câmara de Neubauer. Realizou-se a diluição de 1:200 (10 μL de sangue e 2 mL da solução de formol citrato) e o material foi reservado à 4 °C e iniciada a contagem no dia seguinte após a coleta. Neste parâmetro, o conteúdo foi agitado e foi preenchido cada retículo da câmara de Neubauer. As células foram contadas em microscópio à 400x de aumento. O resultado foi expresso em células por microlitro (10^6 células μL^{-1}).

A partir dos dados obtidos pelas análises de série vermelha supracitadas, calcularam-se os índices hematimétricos, VCM (volume corpuscular médio - avaliação do volume dos eritrócitos), HCM (hemoglobina corpuscular média - determina a quantidade de hemoglobina nos eritrócitos) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média – relacionada com a concentração da hemoglobina nos eritrócitos) (WINTROBE, 1934; RANZANI-PAIVA et al., 2013) pelas equações:

- $\text{VCM (fL)} = (\text{hematócrito} * 10) / \text{número de eritrócitos};$
- $\text{HCM (pg)} = (\text{taxa de hemoglobina} * 10) / \text{número de eritrócitos};$
- $\text{CHCM (g dL}^{-1}\text{)} = (\text{taxa de hemoglobina} * 100) / \text{hematócrito}.$

4.3.4. Bioquímica Sanguínea

As variáveis proteínas plasmáticas totais (PPT) e albumina (ALB) foram determinadas por meio de kits comerciais (LABTEST®), em ensaio colorimétrico de ponto final.

Para análise de proteínas plasmáticas totais, 20 µL da amostra de soro foram adicionados a 1,0 mL do reagente. Após a homogeneização, o conteúdo foi incubado (banho-maria) a 37° C durante 10 minutos e realizada a espectrofotometria em 545 nm. O princípio desta análise baseia-se nos íons de cobre (Cu^{+2}) presentes no reagente biureto (meio alcalino), que reagem com as ligações peptídicas das proteínas e a absorbância da cor púrpura formada é proporcional à concentração proteica na amostra.

Procedeu-se a avaliação da albumina utilizando 10 µL da amostra de soro em 1,0 mL de reagente. Após misturar e aguardar o período entre 2 e 10 minutos em temperatura ambiente, determinou-se a absorbância em 630 nm. Como característica a albumina se liga a diversos ânions orgânicos e moléculas de corantes. No procedimento citado, a medição do desvio da absorvidade do corante verde de bromocresol é atingida quando este se liga à albumina, permitindo a análise colorimétrica.

Os valores de globulinas (GLOB) foram obtidos subtraindo o valor de albumina de proteínas totais.

Os dados dos parâmetros bioquímicos foram expressos em gramas por decilitro (g dL^{-1}).

4.4. Desempenho Produtivo

Todos os peixes, no início, antes do fornecimento das dietas-teste e no final do experimento, após 45 dias de alimentação, foram anestesiados (benzocaína, $0,1 \text{ g L}^{-1}$) e submetidos à pesagem e medida de comprimento. Caso houvesse mortalidade de peixes, independente da necessidade para as análises, os mesmos eram contabilizados. Cada grupo alimentado, inclusive cada repetição, possuía seu recipiente de ração individual. As dietas-teste contidas nos seus respectivos

recipientes foram pesadas semanalmente para cálculo do consumo alimentar total (CAT). As taxas avaliadas, ganho de peso total (GPT), consumo alimentar diário (CAD), conversão alimentar aparente (CAA), consumo de proteína (CP), taxa de eficiência proteica (TEP), taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência (S) foram estimadas pelas seguintes equações:

- $GPT(g) = (\text{peso corporal final} - \text{peso corporal inicial} / \text{peso corporal inicial}) * 100$
- $CAD(g) = [\text{alimento consumido} (\text{dias de alimentação} * \text{peso corporal} / 2)] * 100$
- $CAA = \text{consumo de alimento} (g) / \text{ganho de peso total} (g);$
- $CP(g) = (\text{consumo de alimento} (g) * \text{proteína na ração} (g) / 100$
- $TEP = \text{ganho de peso} (g) / \text{proteína na dieta} (g);$
- $TCE (\%/dia) = 100 [(\ln \text{ peso corporal final} - \ln \text{ peso corporal inicial}) / \text{dias}];$
- $S (\%) = 100 - [(\text{peixes mortos} * 100) / \text{número inicial de peixes}].$

4.5. Digestibilidade de Proteína

4.5.1. Dietas

As dietas-teste utilizadas para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente foram as mesmas, sendo que, para adição do marcador, as seis dietas foram trituradas e, desta vez, peletizadas (Figura 6). 1,0 % de óxido de cromo III (Cr_2O_3), utilizado como marcador inerte foi adicionado às dietas e para o seu processamento foi acrescido 50% de água, facilitando a peletização (aproximadamente 3 a 4 mm de diâmetro), realizada em moedor de carne. As dietas umedecidas foram granuladas manualmente e secas em estufa à 60 °C, por 24 horas.



Figura 6. Ração peletizada acrescida de óxido de cromo III (Cr_2O_3).

4.5.2. Coleta e Processamento das Fezes

Após 45 dias de alimentação com as dietas extrusadas, seu fornecimento foi, então, interrompido. Selecionou-se um total de 192 peixes ($228,46 \pm 15,87$ g e $22,4 \pm 0,8$ cm), 32 animais por tratamento (8 em cada caixa) e foi iniciado o arroçoamento diariamente (três vezes ao dia, às 09:00, 13:00 e 17:00 horas) com as dietas-teste peletizadas e acrescidas de indicador. Durante 5 dias, nas mesmas caixas com capacidade de 310 L, as dietas foram fornecidas para adaptação à nova ração e completa eliminação de resíduos da ração extrusada. Para a coleta de fezes foram utilizados coletores (em duas etapas) construídos segundo o sistema de Guelph modificado (GONÇALVES, 1998), utilizando incubadoras de fibra de vidro de 80 L de capacidade. Os coletores foram dispostos e adaptados ao lado das caixas de 310 L (Figura 7), de forma que houvesse fluxo e renovação de água constante normalmente nos dois ambientes.



Figura 7. Incubadoras (80 L) adaptadas e dispostas ao lado das caixas experimentais (310 L) para coleta de fezes.

Passados os cinco dias de alimentação, os peixes foram colocados nas incubadoras e as fezes coletas após 12 horas de incubação. Durante este período, os tubos coletores ficaram envolvidos por gelo em recipientes de isopor.

A coleta não pôde ocorrer em intervalos curtos, pois, devido ao tamanho atingido e territorialismo natural da espécie, os peixes não puderam ser colocados todos de uma só vez nas incubadoras. Então, realizaram-se as coletas, após o período citado, em duas etapas.

O material recolhido foi depositado em tubos plásticos, etiquetados e armazenados à - 20 °C até o momento do processamento. Inicialmente, as fezes foram centrifugadas à 3200 rpm durante 15 minutos para eliminação do excesso de água, pesadas e congeladas novamente. Posteriormente, liofilizadas, maceradas e peneiradas para retirada de eventuais escamas e resíduos exteriores às fezes. As

fezes e também as rações foram, então, moídas em micro moinho e armazenadas à - 20 °C até a utilização para as análises laboratoriais.

4.5.3. Determinação dos Coeficientes de Digestibilidade Aparente de Proteína

O teor óxido de cromo III (Cr_2O_3) das fezes e rações foi mensurado pelo método de digestão em bloco à 250 °C com ácido nítrico e perclórico e leitura em espectrofotômetro a 350 nm (FURUKAWA; TSUKAHARA, 1976). Nesta análise, 0,1 g da amostra foi digerida com 3 mL de ácido nítrico e 4 mL de ácido perclórico em balões Kjeldahl até obtenção de uma coloração alaranjada. Após a digestão, adicionou-se água destilada e ajustou-se o volume da amostra em balão volumétrico. Obteve-se uma colocação amarelada e foi realizada a espectrofotometria.

Os valores de proteína bruta foram obtidos pelo método de micro-Kjeldahl, pela multiplicação da porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,25. Os coeficientes de digestibilidade aparente de proteína bruta (CD_{PB}) foram calculados pela fórmula proposta por NOSE (1960):

$$\text{CD}_{\text{PB}}(\%) = 100 - 100 * \left(\frac{\% \text{ indicador na dieta}}{\% \text{ indicador nas fezes}} * \frac{\% \text{ proteína nas fezes}}{\% \text{ proteína na dieta}} \right)$$

4.6. Resistência à Bactéria

4.6.1. Bactéria e Meio de Cultura

A cepa de *Lactococcus garvieae* foi previamente isolada de tilápia-do-Nilo acometida em piscicultura e mantida em estoque no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp – Caunesp, Jaboticabal / SP. A bactéria foi inoculada em caldo BHI e incubada a 25 °C durante 24 horas. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada (3000 rpm durante 10 minutos), lavada três vezes com tampão fosfato estéril (PBS) e ressuspendida na mesma solução. A massa bacteriana foi centrifugada três vezes para completa lavagem e

retirada de resíduos de meio de cultura. Após este procedimento, a suspensão bacteriana foi diluída em 100 mL de PBS e a concentração ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de acordo com a escala de MacFarland.

4.6.2. Desafios Bacterianos por Co-habitação

Foram realizados quatro desafios bacterianos por co-habitação. Para o primeiro, foram utilizados 168 juvenis de tilápia ($125,3 \pm 5,09$ g e $17,6 \pm 0,33$ cm) (distribuídos em 7 peixes por caixa) e, após sete dias de alimentação com as dietas extrusadas (0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; e 15,0 g kg⁻¹), dois peixes de cada caixa foram retirados, anestesiados (benzocaína, 0,1 g L⁻¹), e inoculados intracelomaticamente com 1,0 mL de solução PBS contendo $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de *Lactococcus garvieae* (valor correspondente à DL₅₀) e introduzidos novamente nas caixas experimentais. Para diferenciar os peixes inoculados, foi realizada uma “ruptura” e retirado o 3º ou 4º raio da nadadeira dorsal. Os peixes foram monitorados cinco vezes ao dia (a cada 2 horas) quanto à presença de sinais clínicos durante 15 dias e a mortalidade dos peixes não-inoculados, registrada. Neste período de observação, os peixes foram alimentados continuamente com as rações-teste.

Em caso de mortalidade, os peixes eram submetidos às análises microbiológicas de amostras de cérebro e rim cefálico para reisolamento bacteriano. Para tanto, os peixes foram lavados externamente com água e detergente neutro, desinfetados com solução de álcool 70% e submetidos à biópsia renal e cerebral para reisolamento e cultivo bacteriano utilizando meio de cultura TSB (Trypticase Soy Broth). As amostras foram incubadas a 25 °C durante o período de até cinco dias, sendo posteriormente descartadas em caso de ausência de crescimento bacteriano até este período.

Nas amostras que apresentaram crescimento, realizaram-se teste de coloração de Gram, oxidase (Probac do Brasil ®), catalase, produção de hemólise em ágar sangue e comprovação bioquímica pelo kit comercial API 20 Strep (BioMérieux®, França). Os resultados obtidos estão de acordo com Austin e Austin (1999) e Romalde e Toranzo (2002) (Tabela 3) e foram caracterizados como 99,9% de compatibilidade à *Lactococcus garvieae*.

Tabela 3. Características bioquímicas de *Lactococcus garvieae*.

Teste	Reação ¹	Teste	Reação
Catalase	-	β -Galactosidase	-
Oxidase	-	Lactose	-
Gram	+	Manitol	+
Hipurato	-	Fosfatase alcalina	-
Pirazinamidase	+	α -Hemólise	+
Trealose	+	Leucina arilamidase	+
Ribose	+	Adenilato-ciclase	+
Rafinose	-	β -Glucuronidase	-
Inulina	-	Amidalina	-
Arabinose	+	Esculina	+
α -Galactosidase	-	VP	+
Sorbitol	-	Glicogênio	-

¹ Reação negativa (-); Reação Positiva (+).

Todos os procedimentos foram repetidos nos outros três desafios, diferindo apenas no tempo de alimentação pré-inoculação, sendo os peixes desafiados após 15 dias no segundo, 30 dias no terceiro e 45 dias no quarto desafio.

4.7. Análise Estatística

Os dados dos parâmetros de hematologia, imunidade e resistência bacteriana foram submetidos à análise de variância de duas vias ("Two-way" ANOVA), e as médias comparadas utilizando o teste de Tukey (à 0,05% de significância). Para os dados de desempenho e digestibilidade aparente de proteína bruta, realizou-se o teste F, sendo também, posteriormente, realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para os valores de F que indicaram diferença significativa ($p < 0,01$) de acordo com Snedecor e Cochran (1974) no programa SAS 9.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação Imunológica, Hematológica e Bioquímica

Este estudo avaliou os efeitos da inclusão de MOS na dieta oferecida por um período de até 45 dias para observar a ação na imunidade, hematologia e bioquímica sanguínea de tilápia-do-Nilo. Não foi possível verificar diferenças significativas nos grupos alimentados com MOS diante dos animais alimentados com a dieta ausente do prebiótico nos parâmetros avaliados.

Os valores dos parâmetros imunológicos analisados estão descritos na Tabela 4. Os resultados de trombócitos e leucócitos totais são mostrados na Tabela 5 e as médias dos leucócitos individuais são apresentadas na Tabela 6. Os valores da mensuração da série vermelha do sangue estão na Tabela 7 e os índices hematimétricos obtidos, na Tabela 8. Pâmetros bioquímicos sanguíneos estão descritos na Tabela 9.

5.1.1. Imunologica Inata

As respostas imunológicas inata e específica são fundamentais para a defesa de mamíferos e outros vertebrados, todavia, para os peixes, acredita-se que respostas inespecíficas (celulares) sejam mais efetivas (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), que representam a atividade respiratória de leucócitos, avaliadas pela análise de “burst” respiratório ou oxidativo, também tem funcionalidade importante no peixe, sendo caracterizada como agente bactericida (SECOMBES; FLETCHER, 1992), que age nas membranas, destruindo os patógenos invasores (BASHEERA-JOHN et al., 2002).

Neste estudo, a atividade respiratória dos leucócitos não foi influenciada ($p>0,05$) pelos diferentes níveis de inclusão de MOS nos diferentes períodos de alimentação (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros imunológicos tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).

	MOS ⁴ (g kg ⁻¹)	Período				
		Dia 0	7 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias
Burst Oxidativo ¹ (DO)	0,0	0,510±0,23	0,397±0,06	0,419±0,06	0,451±0,09	0,267±0,15
	2,0	0,443±0,08	0,404±0,04	0,408±0,05	0,409±0,03	0,257±0,03
	4,0	0,411±0,05	0,340±0,04	0,364±0,12	0,402±0,07	0,209±0,09
	8,0	0,424±0,18	0,371±0,11	0,480±0,06	0,407±0,12	0,271±0,08
	10,0	0,378±0,09	0,364±0,08	0,378±0,04	0,363±0,06	0,270±0,05
	15,0	0,420±0,12	0,398±0,08	0,433±0,13	0,414±0,13	0,274±0,07
Lisozima ² (ng mL ⁻¹)	0,0	20,97±8,78	14,79±5,47	22,20±6,62	21,37±4,45	17,50±6,07
	2,0	17,17±4,59	13,31±2,22	16,22±5,38	16,78±5,45	22,80±9,24
	4,0	17,15±6,38	20,94±5,77	19,62±2,91	21,05±6,82	17,43±6,93
	8,0	16,92±7,75	22,22±9,99	21,39±6,29	19,40±6,80	20,27±11,16
	10,0	23,51±8,78	15,32±2,38	17,15±4,40	23,88±9,70	20,90±4,78
	15,0	19,89±6,50	18,52±4,58	17,35±7,96	20,06±5,19	24,86±7,38
Complemento ³ (segundos)	0,0	141,17±40,10 ^{a5}	204,83±157,14 ^{ab}	95,83±32,01	89,00±59,49	88,33±43,03
	2,0	171,67±53,45 ^a	227,00±95,78 ^{ab}	129,67±51,41	67,67±38,76	74,80±23,18
	4,0	170,00±71,67 ^a	222,00±127,62 ^{ab}	122,17±42,48	88,50±20,48	98,33±32,52
	8,0	130,83±37,79 ^a	121,33±56,31 ^a	163,00±82,52	68,83±12,37	124,33±87,30
	10,0	135,67±56,01 ^a	284,33±111,98 ^b	161,00±78,26	148,17±132,62	178,67±63,61
	15,0	318,17±63,61 ^b	148,67±50,78 ^a	161,00±154,45	86,33±13,76	134,83±94,10

¹ Burst Oxidativo: atividade respiratória de leucócitos; ² Lisozima: concentração de lisozima; ³ Complemento: atividade do sistema complemento (quantidade de tempo necessário para lisar 50% da suspensão de hemácias);

⁴ MOS: mananoligossacarídeo na dieta; ⁵ Médias seguidas de diferentes letras diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0.05).

Em similaridade com o presente estudo, a alimentação para “tambor vermelho” (*Sciaenops ocellatus*), por 60 dias, com quatro prebióticos diferentes, não afetou significativamente a atividade respiratória dos leucócitos no grupo alimentado com dieta suplementada com MOS (10,0 g kg⁻¹) (ZHOU; BUENTELLO; GATLIN III, 2010). Diferentemente, foi relatada maior atividade respiratória de leucócitos em rohu (*Labeo rohita*) alimentados por 60 dias com dieta contendo 1,0 g kg⁻¹ de MOS (ANDREWS et al., 2009). Em bagre africano (*Clarias gariepinus*) alimentados com por 0, 12, 30 e 45 dias com dieta suplementada com 1,0 g kg⁻¹ MOS, a atividade respiratória dos leucócitos foi superior nos peixes suplementados durante as duas

primeiras semanas (YOSHIDA; KRUGER; INGLIS, 1995). Depois desse período, os valores decaíram e se estabilizaram até 45 dias de suplementação.

A lisozima é importante na defesa do organismo e é considerada a primeira barreira contra a ação de bactérias. Ela pode ser considerada um parâmetro para diagnosticar a saúde e resistência do peixe (SAURABH; SAHOO, 2008). O sistema complemento participa de maneira influente no sistema imunológico inato. Por meio de proteínas solúveis, age na quimiotaxia dos leucócitos, no processo de fagocitose, inativação de toxinas bacterianas e opsonização (SECOMBES, 1996; CLAIRE; HOLLAND; LAMBRIS, 2002; BOSHRA; SUNYER, 2006).

No presente estudo não foi constatado melhora da atividade do sistema complemento e concentração de lisozima sérica com a utilização das dietas suplementadas com mananoligossacarídeo perante os peixes alimentados com a dieta controle. Resultados semelhantes foram relatados em carpa (*Cyprinus carpio*) com dietas contendo 0,0; 0,5; 1,5; e 2,5 g kg⁻¹ de MOS, por 60 dias (JAFARI; BABOLI; ALISHAHI, 2013). A atividade de lisozima e complemento entre os peixes alimentados com os níveis de inclusão do prebiótico não foram significativas comparadas ao grupo controle. Também, *Dicentrarchus labrax* alimentados, por 67 dias, não apresentaram diferenças significativas para as mesmas variáveis nos grupos suplementados com 4,0 g kg⁻¹ e 2,0 g kg⁻¹ de MOS na dieta (TORRECILLAS et al., 2007). Ao contrário, carpas prussianas (*Carassius auratus gibelio*), alimentadas por 60 dias, apresentaram aumento significativo da atividade de lisozima e atividade do sistema complemento nos peixes alimentados com 4,5 g kg⁻¹ MOS na dieta quando comparado aos demais níveis de inclusão (1,5 g kg⁻¹ e 3,5 g kg⁻¹) e ao grupo controle (AKRAMI et al., 2012a). Com 10,0 g kg⁻¹ MOS na dieta, por 60 dias, *Sciaenops ocellatus* mostraram valores superiores de atividade de lisozima em relação ao grupo controle (ZHOU; BUENTELLO; GATLIN III, 2010).

Estudos mostram a ocorrência de receptores em mamíferos como colectinas, Dectina-2 e o ligante-I-CAM-3 não integrina específico de células dendríticas (DC-SIGN), Toll-like receptor 4 (TLR-4), receptor de manose (MR) (WILLMENT; BROWN, 2007) que por meio da ligação com a manose presente no MOS, desencadeiam fatores da resposta imunológica inata que estimulam, modulam ou auxiliam na defesa. Mesmo com a ausência de estudos envolvendo estes receptores de manose

em peixes, há resultados positivos com a utilização deste prebiótico sobre parâmetros imunológicos, sugerindo tal ação. Porém, não foi observada influência do MOS sobre os parâmetros avaliados neste estudo.

Como citado anteriormente, também, não é incomum resultados em que parâmetros de imunidade inata de peixes não tenham sofrido alterações após alimentação com dieta contendo mananoligossacarídeo em outras espécies. Talvez a dosagem e administração do MOS na avaliação imunológica da tilápia-do-Nilo, seja intraespecífica, e/ou talvez ocorra em períodos acima de 45 dias de alimentação. Assim como *Oreochromis niloticus* alimentadas com dieta suplementada com 2,0 g kg⁻¹ de mananoligossacarídeo, que apresentaram valores superiores de atividade de lisozima e complemento, após dois meses de alimentação (ABU-ELALA; MARZOUK; MOUSTAFA, 2013). No entanto, como são poucos os trabalhos publicados encontrados com esta espécie em avaliação dos parâmetros realizados neste estudo para verificação da imunológica inata, sugerem-se mais estudos com administração de mananoligossacarídeo para tilápia-do-Nilo para maiores interpretações.

5.1.2. Hematologia

Os leucócitos são componentes sanguíneos importantes para a resposta imune inata e a análise dessas células é uma referência do estado de saúde dos peixes (MISRA et al., 2006).

Neste estudo, com a exceção da quantidade de eosinófilos (após sete dias de alimentação) e trombócitos (após 15 dias), não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros da série branca do sangue (Tabelas 5 e 6) entre os níveis de mananoligossacarídeo nas dietas, nos diferentes períodos de alimentação.

Tabela 5. Contagem de trombócitos e leucócitos totais de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).

	MOS ³ (g kg ⁻¹)	Período				
		Dia 0	7 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias
TROMB ¹ (10 ³ células µL ⁻¹)	0,0	53,1±32,2	56,4±35,5	121,4±66,8 ^{a4}	103,6±85,0	116,6±64,5
	2,0	39,1±27,4	86,0±67,2	50,1±67,5 ^b	81,5±74,4	130,9±68,6
	4,0	53,1±15,2	71,0±65,6	75,2±41,7 ^{ab}	99,6±77,7	114,8±76,4
	8,0	80,3±55,7	59,3±37,3	82,1±38,4 ^{ab}	89,5±51,6	148,7±81,0
	10,0	64,0±41,4	149,3±83,8	74,8±63,3 ^{ab}	120,6±74,9	124,1±70,8
	15,0	67,9±42,8	108,1±70,8	113,5±95,2 ^{ab}	100,1±19,9	170,3±69,1
LEUC ² (10 ³ células µL ⁻¹)	0,0	197,2±126,4	215,2±74,9	165,8±12,0	201,6±73,3	208,1±99,4
	2,0	260,0±111,3	201,3±81,3	212,6±90,6	246,1±105,3	218,4±48,2
	4,0	219,8±63,6	223,0±134,9	208,4±60,3	228,1±80,1	173,2±65,1
	8,0	237,0±35,0	211,1±12,4	183,8±114,8	169,1±82,7	177,4±47,0
	10,0	209,3±100,7	252,5±99,4	209,2±95,6	244,1±47,9	209,5±70,2
	15,0	216,7±90,2	228,2±17,6	187,4±87,8	228,7±95,7	195,0±47,2

¹ TROMB: trombócitos totais; ² LEUC: leucócitos totais; ³ MOS: mananoligossacarídeo na dieta; ⁴ Médias seguidas de diferentes letras diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0.05).

Tabela 6. Contagem diferencial de leucócitos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).

	MOS ⁶ (g kg ⁻¹)	Período				
		Dia 0	7 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias
MON ¹ (10 ³ células µL ⁻¹)	0,0	4,49±3,98	2,58±2,24	2,75±3,95	1,66±1,42	5,97±10,22
	2,0	7,78±3,45	3,57±4,11	1,95±1,94	1,23±1,46	2,57±1,65
	4,0	4,45±7,42	1,98±1,72	1,85±1,23	3,37±1,80	0,99±1,66
	8,0	7,71±7,18	2,49±3,14	1,29±1,00	1,83±1,77	1,76±2,10
	10,0	3,94±1,98	2,52±2,57	1,26±1,07	1,37±0,91	1,86±3,49
	15,0	6,61±2,83	2,58±2,65	1,94±0,70	2,32±3,28	3,26±1,57
LINF ² (10 ³ células µL ⁻¹)	0,0	204,15±124,87	202,50±73,99	173,95±104,79	188,93±70,87	186,47±93,22
	2,0	234,75±108,02	184,09±77,53	208,83±88,12	222,30±94,87	204,60±43,28
	4,0	207,35±62,21	212,56±125,24	195,38±58,13	213,73±79,29	159,05±62,00
	8,0	210,06±41,86	195,40±16,39	174,81±116,27	156,35±74,28	163,77±47,04
	10,0	178,84±80,57	236,41±90,57	198,76±94,30	201,23±46,91	189,46±59,17
	15,0	191,06±93,60	205,93±16,38	202,64±154,59	212,89±88,45	177,65±45,51
BAS ³ (10 ³ células µL ⁻¹)	0,0	0,00±0,00 ^{b7}	0,00±0,00	0,06±0,17	0,18±0,51	0,00±0,00
	2,0	0,44±0,77 ^b	0,09±0,25	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,35
	4,0	1,05±1,08 ^a	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	8,0	0,25±0,58 ^b	0,03±0,08	0,17±0,49	0,00±0,00	0,00±0,00
	10,0	0,14±0,28 ^b	0,00±0,00	0,00±0,00	0,19±0,52	0,14±0,39
	15,0	0,31±0,54 ^b	0,00±0,00	0,00±0,00	0,20±0,57	0,00±0,00
EOS ⁴ (10 ³ células µL ⁻¹)	0,0	2,30±1,84	6,53±2,98 ^{ab}	8,20±8,66	5,46±2,75	8,15±5,52
	2,0	2,47±2,30	9,96±7,49 ^a	3,50±3,01	15,12±1,31	5,36±4,98
	4,0	3,42±2,17	7,85±5,58 ^{ab}	4,74±4,13	5,49±4,08	10,01±3,35
	8,0	6,91±3,62	6,65±6,45 ^{ab}	3,41±4,42	6,04±7,40	5,86±4,60
	10,0	4,97±4,38	7,62±7,49 ^{ab}	4,66±3,26	13,38±6,26	7,01±5,12
	15,0	6,30±5,07	2,71±6,68 ^b	4,72±4,02	9,51±10,82	7,26±4,49
NEUT ⁵ (10 ³ células µL ⁻¹)	0,0	5,58±3,62 ^{abc}	3,40±2,00	3,10±2,26	5,24±4,87	6,35±8,27
	2,0	14,20±6,24 ^a	6,12±5,73	4,53±2,38	6,44±4,17	5,77±5,57
	4,0	3,77±2,85 ^c	7,32±6,46	6,44±5,60	10,47±4,40	4,10±3,94
	8,0	13,91±12,46 ^{ab}	6,16±6,17	3,16±2,07	4,56±4,02	8,38±6,64
	10,0	7,45±2,49 ^{a bc}	4,18±3,35	5,55±3,26	2,08±1,33	3,83±1,61
	15,0	6,43±7,77 ^{bc}	7,76±6,73	6,27±4,65	6,64±17,98	3,84±3,13

¹ MON: monócitos; ² LINF: linfócitos; ³ BAS: basófilos; ⁴ EOS: eosinófilos; ⁵ NEUT: neutrófilos; ⁶ MOS: mananoligossacarídeo na dieta; ⁷ Médias seguidas de diferentes letras diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0.05).

O MOS tem como uma de suas ações, estimular e modular o sistema imunológico por meio da ligação da manose às células de defesa do animal, fazendo com que haja liberação de diversos mecanismos de resposta imune inata como opsonização e liberação de citocinas e proteínas do sistema completo. Outra função do mananoligossacarídeo é eliminar bactérias patogênicas intestinais por meio da ligação com as fímbrias (sítios de manose) tipo I do microrganismo.

Estudos sobre a presença de receptores de manose em células imunitárias de peixes não são encontrados. Portanto, como também não pode-se atribuir o aumento das células de defesa após a ligação de receptores com a manose presentes no MOS em peixes, a invariabilidade destas células nos animais alimentados com dietas contendo o prebiótico, em relação ao grupo controle, neste estudo, pode ser explicada pela ausência de estímulo de antígenos. Com a eliminação de agentes patogênicos proporcionada pelo prebiótico, provavelmente não houve a ativação das células de defesa para focos de infecção. Ou também, que a ação de estimulação das células de defesa, possa ocorrer em outros períodos e/ou dosagens de administração do mananoligossacarídeo especificamente para *Oreochromis niloticus*.

Em concordância, após utilização de dietas contendo 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 g kg⁻¹ de MOS para juvenis de tilápia, após 45 dias, não foi evidenciado aumento significativo de leucócitos entre os diferentes níveis do prebiótico (SADO; BICUDO; CYRINO, 2008). Também, em experimento realizado com carpa (*Cyprinus carpio*), não foram encontradas diferenças significativas nos linfócitos e monócitos, entre os grupos suplementados com MOS e o grupo controle (JAFARI; BABOLI; ALISHAHI, 2013). Quanto à porcentagem de leucócitos e neutrófilos, em estudo com dietas suplementada com MOS para *Huso huso*, por 46 dias, também, não foram encontrados valores significativos (RAZEGHI-MANSOUR et al., 2012). Em catfish (*Ictalurus punctatus*) alimentados com dietas suplementadas com 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 g kg⁻¹ de MOS, por sete semanas, não diferenças significativas na análise de leucócitos totais, granulócitos e linfócitos (ZHU et al., 2012). Diferentemente, no último estudo supracitado, foram encontrados maiores valores para a quantidade de monócitos nos peixes alimentados com a dieta contendo 2,0 g kg⁻¹ de MOS em relação ao grupo controle. Juvenis de carpa (*Cyprinus Carpio*) alimentados com

dietas contendo mananoligossacarídeo ($0,0 \text{ g kg}^{-1}$, $1,0 \text{ g kg}^{-1}$, $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ e $3,0 \text{ g kg}^{-1}$) não apresentaram diferenças significativas no número de leucócitos, monócitos e neutrófilos após 45 dias de alimentação, todavia, com o grupo alimentado com $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS na dieta apresentaram maior número de linfócitos (AKRAMI et al., 2012b). Diferente dos artigos supracitados, com utilização de dietas suplementadas com MOS ($0,0$; $1,0$; $2,0$ e $4,0 \text{ g kg}^{-1}$) para alevinos de *Labeo rohita*, por 60 dias, foi encontrado aumento significativo na quantidade de leucócitos totais nos peixes suplementados com $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS em relação às demais dietas (ANDREWS et al., 2009).

Os trombócitos, nos peixes, participam do processo de coagulação sanguínea (CASILLAS; SMITH, 1977) e também auxiliam o sistema imunológico, através de fagocitose (HILL; ROWLEY, 1996). O número de trombócitos, após 15 dias de alimentação com suplementação de MOS, variou significativamente ($p < 0,05$). O grupo controle apresentou maior valor para esta variável. Isso infere que os peixes suplementados com o prebiótico não sofreram imunomodulação positiva também para esta célula.

A funcionalidade imunitária dos eosinófilos é incerta. Em *Oreochromis niloticus*, estas células são as últimas a participar de um processo inflamatório e são células fagocitárias de partículas de zimosan (SUZUKI, 1986). A quantidade de eosinófilos, neste estudo, após sete dias de alimentação com o prebiótico, foi afetada pelos diferentes níveis de suplementação. Os peixes alimentados com a dieta contendo $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS, após sete dias, apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0,05$) que os da dieta contendo $15,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS, mas em relação aos demais níveis de suplementação, não houve diferença, inclusive do tratamento controle. Maior porcentagem de eosinófilos foi contatada em *Huso huso* alimentados com $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS por 46 dias (RAZEGHI-MANSOUR et al., 2012). Diferentemente, a inclusão de MOS na dieta para juvenis de carpa (*Cyprinus Carpio*) ($1,0 \text{ g kg}^{-1}$, $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ e $3,0 \text{ g kg}^{-1}$) não alterou o número de eosinófilos, comparada aos peixes alimentados com a dieta controle (AKRAMI et al., 2012b).

Alterações na contagem de trombócitos e leucócitos podem ser em decorrência de estresse, como: maior número de leucócitos em tambaquis

(TAVARES-DIAS et al., 2001) e em híbrido tambacu (MARTINS et al., 2002); diminuição ou estabilidade no valor de trombócitos de pacu (MARTINS et al., 2000) e tambacu (MARTINS et al., 2002). E, como os dados obtidos neste estudo para trombócitos (após 15 dias) e eosinófilos (após 7 dias), não foram atribuídos aos tratamentos aplicados, essa diferença pode ser devido à fatores externos às dietas como o estresse de captura dos peixes amostrados ou estresse sofrido pela agressividade em determinado grupo isolado. Pois, a dominância em grupo social, pode ocorrer para se ter acesso a alimento, parceiros para acasalamento (o que não é o caso deste estudo, pois, todos os animais eram machos), abrigo e/ou território (RIDLEY, 1995). Essa dominância é estabelecida por meio de interações agressivas e ocorrentes em diversos grupos de animais (HUNTINGFORD; TURNER, 1987; RIDLEY, 1995), as quais podem desencadear um estado de desequilíbrio fisiológico.

Com relação às variáveis hematológicas de série vermelha, não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos que receberam o prebiótico após 15, 30 e 45 dias de alimentação, mas após 7 dias houve um aumento da hemoglobina (Hb) nos peixes alimentados com a dieta controle e com dieta suplementada com 4,0 g kg⁻¹ de MOS em comparação com peixes alimentados com 10 g kg⁻¹ do prebiótico na dieta (Tabela 7). Na análise de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), no mesmo período, também houve um aumento significativo no grupo alimentado com dieta com 4,0 g kg⁻¹ de MOS diante do grupo alimentado com 10 g kg⁻¹ do prebiótico na dieta (Tabelas 8). Também, após 7 dias de alimentação, o índice de hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentou maiores valores nos animais alimentados com 4,0 g kg⁻¹ de mananoligossacarídeo em comparação aos grupos de peixes alimentados com 2,0, 10,0 e 15,0 g kg⁻¹.

Tabela 7. Parâmetros hematológicos de série vermelha de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta suplementada com mananoligossacarídeo (MOS).

	MOS ⁴ (g kg ⁻¹)	Período				
		Dia 0	7 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias
Ht ¹ (%)	0,0	29,5±3,42	30,4±3,78	29,0±2,78	37,5±2,55	33,8±1,49
	2,0	30,3±1,39	29,0±2,88	28,8±1,83	32,1±3,44	31,9±3,40
	4,0	32,8±4,41	29,0±3,93	29,6±3,34	31,0±3,07	32,0±3,51
	8,0	30,0±4,72	30,0±3,20	28,9±3,14	32,1±4,09	3,1±3,80
	10,0	28,8±2,71	29,0±3,89	28,6±3,70	32,9±4,61	32,8±3,92
	15,0	29,9±2,23	30,8±2,62	28,8±1,91	34,6±7,05	33,8±4,40
Hb ² (g dL ⁻¹)	0,0	8,06±1,75	10,7±1,74 ^a	8,90±2,27	9,73±1,39	9,00±1,54
	2,0	7,96±1,78	9,48±1,09 ^{ab}	8,72±2,04	9,54±0,76	8,91±1,42
	4,0	8,08±1,95	11,18±1,26 ^a	8,23±1,45	8,28±1,25	9,18±1,65
	8,0	9,12±2,30	9,90±1,53 ^{ab}	9,21±2,01	9,85±1,59	9,18±1,15
	10,0	8,04±2,09	8,42±1,3 ^b	8,24±1,66	8,70±0,87	8,98±1,25
	15,0	9,79±2,44	9,80±1,21 ^{ab}	9,52±1,75	8,80±1,03	9,03±1,08
RBC ³ (10 ⁶ células µL ⁻¹)	0,0	2,24±0,44	2,58±0,21	2,61±0,34	2,66±0,20	2,45±0,17
	2,0	2,11±0,46	2,71±0,21	2,33±0,32	2,57±0,31	2,44±0,35
	4,0	2,48±0,39	2,40±0,43	2,47±0,41	2,49±0,32	2,50±0,25
	8,0	2,30±0,32	2,61±0,20	2,24±0,26	2,34±0,36	2,46±0,24
	10,0	2,29±0,31	2,59±0,46	2,43±0,20	2,51±0,31	2,57±0,29
	15,0	2,54±0,43	2,78±0,63	2,43±0,30	2,54±,28	2,49±0,16

¹ Ht: hematócrito; ² Hb: hemoglobina; ³ RBC: contagem de eritrócitos; ⁴ MOS: mananoligossacarídeo na dieta; ⁵

Médias seguidas de diferentes letras diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0.05).

Tabela 8. Índices hematimétricos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).

	MOS ⁴ (g kg ⁻¹)	Período				
		Dia 0	7 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias
VCM ¹ (fL)	0,0	135,0±15,22 ^{ab5}	118,2±15,25	112,9±17,89	119,6±10,70	137,9±9,48
	2,0	153,6±52,88 ^a	107,7±13,83	124,7±12,25	125,7±10,86	130,0±21,80
	4,0	132,1±18,24 ^{ab}	122,4±15,88	119,8±30,75	126,0±18,20	129,4±20,19
	8,0	132,9±27,96 ^{ab}	111,8±6,11	129,4±13,71	141,0±33,63	135,8±19,41
	10,0	128,3±27,57 ^{ab}	114,6±22,29	118,4±17,85	131,2±12,87	127,9±1,60
	15,0	119,4±24,46 ^b	117,6±21,94	123,9±14,42	136,2±22,89	138,3±16,58
HCM ² (pg)	0,0	36,6±6,46	41,7±5,88 ^{ab}	35,4±12,42	36,5±4,41	36,7±5,91
	2,0	38,9±8,96	35,2±5,15 ^b	37,4±6,83	37,6±5,22	35,8±3,35
	4,0	33,9±11,46	47,7±9,03 ^a	34,1±7,47	33,2±2,39	36,8±5,41
	8,0	40,1±9,96	37,9±4,99 ^{ab}	40,9±5,63	42,9±9,01	37,4±3,24
	10,0	36,6±14,42	32,9±4,36 ^b	34,2±7,72	35,0±5,17	35,1±4,68
	15,0	39,2±11,39	36,1±5,73 ^b	40,0±9,82	35,0±5,73	37,1±4,35
CHCM ³ (g dL ⁻¹)	0,0	27,2±3,23	35,5±5,20 ^{ab}	31,0±9,11	30,9±5,80	26,7±4,75
	2,0	26,3±5,62	32,7±3,38 ^{ab}	30,4±6,78	30,1±4,44	28,1±4,12
	4,0	25,5±7,10	38,8±4,15 ^a	28,1±5,34	26,9±4,53	28,8±4,38
	8,0	31,3±11,32	32,1±2,91 ^{ab}	31,8±4,90	31,0±5,95	27,9±4,02
	10,0	28,1±7,66	29,1±2,90 ^b	33,0±4,57	26,2±5,29	27,2±4,17
	15,0	32,9±8,17	32,8±3,29 ^{ab}	28,6±5,02	27,0±5,58	27,6±5,25

¹ VCM: volume corpuscular médio; ² HCM: hemoglobina corpuscular média; ³ CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; ⁴ MOS: mananoligossacarídeo na dieta; ⁵ Médias seguidas de diferentes letras diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0.05).

Sabe-se que os parâmetros hematológicos avaliam a sanidade do organismo em um determinado momento e os elementos sanguíneos relacionam-se, quantitativa e proporcionalmente, ao estado funcional do peixe (REBAR et al., 2003; RANZANI-PAIVA et al., 2013). Após alimentação de juvenis de tilápia-do-Nilo por 45 dias com 0,0 g kg⁻¹, 2,0 g kg⁻¹, 4,0 g kg⁻¹, 6,0 g kg⁻¹, 8,0 g kg⁻¹ e 10,0 g kg⁻¹ de MOS na dieta não foram verificadas diferenças significativas nos parâmetros de série vermelha avaliados (SADO; BICUDO; CYRINO, 2008). O mesmo ocorreu em alimentação de carpas (*Cyprinus carpio*) com dietas contendo 0,0; 0,5; 1,5; e 2,5 g kg⁻¹ do prebiótico, por 60 dias (JAFARI; BABOLI; ALISHAHI, 2013) e com

alimentação com MOS para esturjão *Huso huso* por 46 dias (RAZEGHI-MANSOUR et al., 2012).

Após sete dias de alimentação com MOS, o hematócrito, o RBC e o volume corpuscular médio não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) em relação ao controle. Neste mesmo período, a hemoglobina (Hb), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), apesar de sofrerem variações ($p < 0,05$), os valores não diferiram do tratamento controle. Contudo, como os valores apresentados pelo grupo controle e tratado com $4,0 \text{ g kg}^{-1}$ estão acima dos descritos na literatura para a espécie (ALKAHEM, 1994; SUN et al., 1994; UEDA et al., 1997; TAVARES-DIAS; FAUSTINO, 1998; HISANO et al., 2003; ADEPARUSI; AJAYI, 2000; TAVARES-DIAS et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002 citados por TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), pode-se considerar um quadro leve de policitemia (neste caso, refletido na taxa e concentração de hemoglobina nos eritrócitos), provavelmente atribuído à fatores externos às dietas.

Diversos fatores de origens ambientais ou biótica podem alterar as variáveis hematológicas em peixes. Dentre os fatores ambientais destacam-se: sazonalidade; temperatura; oxigênio dissolvido e potencial hidrogeniônico (pH). E os fatores bióticos podem ser: sexo e maturação gonadal; crescimento; parasitismo e estresse (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

As análises de cortisol e glicemia são meios característicos para a verificação de estresse em peixes. Contudo, neste estudo, estes parâmetros não foram analisados. Níveis elevados de cortisol estão diretamente relacionados à diminuição da resistência às doenças desencadeada por um estímulo estressante (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Em peixes estressados, também, em geral, ocorre aumento na glicemia (hiperglicemia), além de variação no perfil hematológico (TAVARES-DIAS et al., 2001; URBINATI; CARNEIRO, 2001; CARNEIRO; URBINATI, 2001 citados por TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Assim, alterações no perfil hematológico de peixes também podem servir como um meio de detectar estresse (TORRES et al., 1986; BARTON; IWAMA, 1991; URBINATI; CARNEIRO, 2001; CARNEIRO; URBINATI, 2001 citado por TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Poucas são as alterações tanto ambientais ou bióticas, ocorridas aleatoriamente em sistema de criação laboratorial. Porém, ações estressantes como a captura podem alterar o

padrão dos parâmetros hematológicos de série vermelha como hemoglobina e índices hematimétricos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Portanto, como as variações no perfil hematológico de série vermelha, contatadas neste estudo, não foram em consequência das diferentes dietas fornecidas e dos demais fatores interferentes e ocorreram somente em um período isolado, elas podem ser atribuídas, provavelmente, ao estresse da captura ou, também, estresse após submissão à agressividade de outros peixes ou mesmo, a maior agressividade dos animais aleatoriamente amostrados.

Ainda, após sete dias de alimentação, os peixes alimentados com a dieta contendo $10,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS apresentaram valores inferiores de Hb, HCM e CHCM ($p < 0,05$). Diferentemente dos dados apresentados neste estudo, o uso de probiótico e prebiótico, para *Oreochromis niloticus*, apontou valores para RBC e Hb significativamente maiores em relação à dieta basal, na dieta contendo $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS por dois meses (ABU-ELALA; MARZOUK; MOUSTAFA, 2013). Também, em estudo com juvenis de carpa (*Cyprinus Carpio*) utilizando dietas contendo diferentes níveis de MOS ($0,0 \text{ g kg}^{-1}$, $1,0 \text{ g kg}^{-1}$, $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ e $3,0 \text{ g kg}^{-1}$), foi constatado aumento significativo, após 45 dias de alimentação, do hematócrito, da quantidade de eritrócitos e hemoglobina no grupo alimentado com $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ MOS (AKRAMI et al., 2012b). Em alimentação para alevinos de *Labeo rohita* por 60 dias com MOS, foi obtido valores de hemoglobina e número de eritrócitos significantemente maiores nos peixes alimentados com dieta contendo $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ do prebiótico em relação aos alimentados com $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ e $4,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS (ANDREWS et al., 2009).

5.1.3. Bioquímica Sanguínea

Juntamente com a concentração de lisozima e a atividade do sistema complemento, os parâmetros bioquímicos “proteínas plasmáticas totais (PPT), albumina (ALB) e globulinas (GLOB)” são considerados parâmetros com características imunológicas.

Os valores de proteínas plasmáticas totais (Tabela 9) variaram significativamente, entre os grupos alimentados com MOS, após sete dias de

alimentação, porém, como aconteceu com outros parâmetros avaliados, esses valores não diferiram dos peixes do grupo controle.

Tabela 9. Parâmetros bioquímicos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).

	MOS ⁴ (g kg ⁻¹)	Período				
		Dia 0	7 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias
PPT ¹ (g dL ⁻¹)	0,0	3,77±0,43	4,58±0,61 ^{ab5}	3,23±0,35	3,24±0,64	3,38±0,18
	2,0	3,77±0,12	4,27±0,90 ^{ab}	2,87±0,46	3,52±0,58	3,29±0,41
	4,0	3,67±0,29	4,31±0,58 ^{ab}	3,02±0,35	3,09±0,58	3,00±0,54
	8,0	3,96±0,62	4,90±1,61 ^a	3,31±0,39	3,09±0,60	3,05±0,76
	10,0	3,91±0,50	3,69±0,42 ^b	3,27±0,35	3,80±1,43	3,28±0,40
	15,0	4,21±0,55	4,40±0,49 ^{ab}	3,02±0,32	3,48±0,48	3,33±0,43
ALB ² (g dL ⁻¹)	0,0	1,16±0,19	0,80±0,19	1,02±0,33	0,98±0,40	1,10±0,21
	2,0	1,22±0,08	0,68±0,08	0,92±0,3	1,26±0,39	0,92±0,32
	4,0	1,09±0,24	0,85±0,24	1,16±0,62	0,97±0,41	1,00±0,33
	8,0	1,17±0,13	0,86±0,13	0,77±0,11	1,01±0,28	0,84±0,33
	10,0	1,02±0,18	0,41±0,18	0,90±0,12	0,86±0,16	0,87±0,21
	15,0	1,17±0,22	0,78±0,22	0,96±0,22	1,19±0,37	0,93±0,13
GLOB ³ (g dL ⁻¹)	0,0	2,61±0,43	3,78±0,48	2,21±0,40	2,26±0,58	2,29±0,30
	2,0	2,55±0,10	3,49±1,08	1,91±0,40	2,27±0,34	2,37±0,33
	4,0	2,54±0,23	3,55±0,60	1,87±0,39	2,12±0,80	2,00±0,48
	8,0	2,79±0,74	4,05±1,66	2,54±0,37	2,09±0,35	2,21±0,66
	10,0	2,89±0,53	3,27±0,54	2,37±0,47	2,94±1,47	2,40±0,39
	15,0	3,04±0,59	3,64±0,67	2,10±0,31	2,29±0,40	2,41±0,34

¹ PPT: proteínas plasmáticas totais; ² ALB: albumina; ³ GLOB: globulinas; ⁴ MOS: mananoligossacarídeo na dieta; ⁵ Médias seguidas de diferentes letras diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0.05).

Além de participarem da manutenção da pressão osmótica, tamponamento, transporte de íons e moléculas, homeostase do animal, as proteínas presentes no sangue também sofrem influência da nutrição e podem melhorar a resistência à infecções (FELDMAN, 2000). Das proteínas encontradas no sangue, além da albumina, também pode-se encontrar outro grupo de proteínas denominadas globulinas (α , β , e γ globulina) (CHOUDHURY et al., 2005), que agem de maneira ativa na resposta imune.

Neste estudo, os parâmetros bioquímicos PPT, ALB e GLOB não apresentaram diferenças ($p>0,05$) em todos os períodos de avaliação e níveis de suplementação de mananoligossacarídeo, em relação ao grupo alimentado com a dieta ausente do prebiótico, indicando, assim, que a inclusão de MOS (nos níveis e períodos apresentados) na dieta, não influenciou efetivamente estes parâmetros. Essa invariabilidade nos parâmetros de proteínas plasmáticas pode indicar ausência de perda sanguínea e equilíbrio iônico no sangue, além de ser mantido um bom aproveitamento nutricional (SOUZA, 2010) nos grupos alimentados até os 45 dias. Um estudo sobre a inclusão de probiótico e prebiótico, em dieta para *Oreochromis niloticus*, proporcionou aumento significativo nas PPT e GLOB (β e γ) nos peixes suplementados com $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS por dois meses em relação à dieta basal (ABU-ELALA; MARZOUK; MOUSTAFA, 2013). Porém, ocorreu similaridade com os resultados deste estudo, os autores citados, não constatarem diferenças significativas na análise de albumina quando comparada à dieta basal. Em dietas contendo diferentes níveis de MOS para rohu (*Labeo rohita*), por 60 dias, valores significativamente elevados tanto para proteínas plasmáticas totais, quanto para albumina e globulina foram constatados nos peixes alimentados com dieta suplementada com $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ de mananoligossacarídeo (ANDREWS et al., 2009).

Somente os valores de proteínas plasmáticas totais (PPT), após 7 dia de alimentação, se mostraram de maneira estatisticamente diferente. O grupo alimentado com $8,0 \text{ g kg}^{-1}$ apresentou médias superiores ao grupo alimentado com $10,0 \text{ g kg}^{-1}$ de mananoligossacarídeo. Isso pode estar associado às ações estressantes (PANKHURST; DEDUAL, 1994). Porém essa relação não foi demonstrada em truta arco-íris (WELLS; PANKHURST, 1999).

A maioria dos parâmetros avaliados neste experimento, tanto imunológicos, hematológicos, quanto bioquímicos, não foi influenciada pela suplementação com mananoligossacarídeo ($p>0,05$), nos diferentes períodos de avaliação. Porém, pesquisas com prebióticos, em avaliação da hematologia e sistema imunológico, apresentam respostas contraditórias. Os resultados do presente estudo podem ter ocorrido pelo fato do MOS ter como função principal aumentar o desempenho produtivo dos animais devido a melhor digestibilidade e absorção de nutrientes em decorrência da maior integridade da mucosa intestinal (maior renovação celular do

epitélio e aumento de células caliciformes) proporcionada pelo prebiótico. Além disso, o MOS também compromete os receptores de manose da fimbria tipo I de potenciais patógenos gram-negativos, como a *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, e previne o ataque à mucosa intestinal, o que também contribui para evitar doenças e melhorar a saúde do animal.

Diante do crescimento da tilápicultura no Brasil, tendo como consequência maior registro de enfermidades, principalmente de origem bacteriana em sistemas intensivos de criação, atrelada ao uso constante e sem critérios dos mais variados antimicrobianos disponíveis no mercado, também com a irregularidade de trabalhos com eficiência do uso de mananoligossacarídeo associado à imunidade de peixes, os resultados deste estudo, apesar de não mostrarem uma alternativa, são importantes para estabelecer e comparar protocolos de imunoestimulação, adequados para maximizar a busca de maior proteção imunológica da espécie. Evitando, assim, o estabelecimento de doenças na criação, contribuindo para melhorar o desempenho zootécnico e sobrevivência dos peixes, que, conseqüentemente, contribuirá principalmente para adoção de boas práticas de manejo, com escolhas de outras vias, para uma criação mais sustentável e mais competitiva.

5.2. Desempenho Produtivo e Digestibilidade de Proteína

Os parâmetros de desempenho produtivo, consumo alimentar total (CAT), consumo alimentar diário (CAD), conversão alimentar aparente (CAA), consumo de proteína (CP), taxa de eficiência proteica (TEP), taxa de crescimento específico (TCE) e a digestibilidade aparente de proteína bruta (CD_{PB}) para tilápia-do-Nilo, neste experimento, não foram influenciados ($p>0,01$) pela suplementação de mananoligossacarídeo na dieta. Contudo, resultados importantes foram constatados. O parâmetro ganho de peso total (GPT) foi significativamente ($p<0,01$) superior nos peixes alimentados com 2,0, 4,0 e 8,0 g kg^{-1} de MOS na dieta (Tabela 10).

Tabela 10. Parâmetros de desempenho produtivo e coeficiente de digestibilidade aparente de proteína bruta de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após 45 dias alimentação com dietas suplementadas com mananoligossacarídeo (MOS).

	C.V. ¹⁰ (%)	Significância ¹²	MOS ¹¹ (g kg ⁻¹)					
			0,0	2,0	4,0	8,0	10,0	15,0
GPT ¹ (g)	8,59	*	87,35 ^{c13}	112,55 ^{ab}	130,88 ^a	113,98 ^a	89,55 ^c	92,63 ^{bc}
CAT ² (g)	8,76	ns	1.065,78	1.151,05	1.060,25	1.029,85	1.092,80	1.004,80
CAD ³ (g)	8,98	ns	25,55	24,58	22,88	22,90	24,28	22,33
CAA ⁴	16,86	ns	1,21	0,93	1,04	0,99	1,12	0,86
CP ⁵ (g)	8,73	ns	309,72	349,12	322,95	314,93	339,75	314,20
TEP ⁶	15,15	ns	3,28	3,59	3,74	3,18	3,01	2,96
TCE ⁷ (%/dia)	1,29	ns	5,29	5,35	5,38	5,30	5,31	4,80
S ⁸ (%)	2,50	*	90,15 ^b	93,05 ^{ab}	97,38 ^a	93,73 ^{ab}	93,75 ^{ab}	93,57 ^a
CD _{PB} ⁹	3,22	ns	88,37	89,22	89,18	89,07	90,66	86,54

¹ GPT: ganho de peso total; ² CAT: consumo alimentar total; ³ CAD: consumo alimentar diário; ⁴ CAA: conversão alimentar aparente; ⁵ CP: consumo de proteína; ⁶ TEP: taxa de eficiência proteica; ⁷ TCE: taxa de crescimento específico; ⁸ S: sobrevivência; ⁹ CD_{PB}: coeficiente de digestibilidade aparente de proteína bruta; ¹⁰ C.V.: coeficiente de variação; ¹¹ MOS: mananoligossacarídeo na dieta; ¹² Significância: * = significativo (p<0,01); ns = não significativo (p>0,01); ¹³ Médias seguidas de diferentes letras diferem significativamente pelo teste F.

O ganho de peso é considerado um dos principais parâmetros para avaliar a produtividade dos animais em uma piscicultura. Os resultados positivos de ganho de peso total (GPT) dos animais alimentados com dietas contendo 2,0, 4,0 e 8,0 g kg⁻¹ de mananoligossacarídeo, podem ser respostas ao consumo do prebiótico. O mananoligossacarídeo é conhecido pela capacidade de modificação da microbiota no intestino e redução da taxa de renovação da mucosa intestinal (SHANE, 2001). Algumas bactérias patogênicas reconhecem sítios de ligação nos açúcares presente no MOS, reduzindo sua colonização no intestino. Assim, além da menor ocorrência de doenças, a mucosa permanece com sua capacidade preservada, para realizar suas funções normais de secreção, digestão e absorção de nutrientes (IJI; TIVEY, 1998), o que pode aumentar o ganho de peso dos animais.

Também pode-se considerar o fato de que polissacarídeos não-amiláceos e β-glucanos (presentes na parede celular de levedura) são polímeros de glicose e os α-mananos (presente no MOS) se constituem de glicose e manose. Isso pode elevar a viscosidade e diminuir a velocidade do alimento em trânsito gástrico e proporcionar

um consumo mais lento (SILVA; NÖRNBORG, 2003), o que conseqüentemente, pode melhorar o aproveitamento nutricional e o ganho de peso.

Mesmo com resultados expressivos encontrados na literatura, trabalhos mostram discordância quanto à ação de níveis MOS em parâmetros de crescimento para diferentes espécies. A alimentação de carpa (*Cyprinus carpio*) com dietas contendo 1,0 g kg⁻¹, 2,0 g kg⁻¹ e 3,0 g kg⁻¹ de mananoligossacarídeo, por 45 dias, não proporcionou melhores resultados de taxa de crescimento específico, conversão alimentar, consumo diário de ração e taxa de eficiência protéica (AKRAMI et al., 2012b). Assim como no ganho de peso dos animais. Também, com a utilização de 0,0 g kg⁻¹; 1,0 g kg⁻¹; 2,0 g kg⁻¹ e 3,0 g kg⁻¹ de MOS na dieta para juvenis de tilápia-do-Nilo, durante 53 dias, não foi observado efeito ($p>0,05$) sobre o ganho de peso e consumo alimentar, mas a utilização de 10,0 g kg⁻¹ resultou em melhores valores ($p<0,05$) de conversão alimentar e taxa de eficiência protéica de juvenis de tilápia-do-Nilo, comparados aos grupos alimentados com dietas suplementadas com 30,0 g kg⁻¹ e 0,0 g kg⁻¹ de mananoligossacarídeo, respectivamente (SCHWARZ et al., 2010). Também, a dieta contendo 10,0 g kg⁻¹ de MOS, por 60 dias, para *L. rohita* proporcionou melhores resultados de ganho de peso comparados aos grupos alimentados com as dietas isenta do imunoestimulante e as contendo 20,0 g kg⁻¹ e 30,0 g kg⁻¹ (ANDREWS et al., 2009). No mesmo trabalho, 10,0 g kg⁻¹ de MOS na dieta apresentou valores superiores ($p<0,05$) de ganho de peso à outros níveis de imunoestimulantes (extrato de levedura - 20,0 g kg⁻¹ e 40,0 g kg⁻¹; proteína hidrolisada e chlorella à 10,0 g kg⁻¹, 20,0 g kg⁻¹ e 40,0 g kg⁻¹) e foram verificados maiores valores ($p<0,05$) de conversão alimentar e taxa de crescimento específicos em peixes alimentados com a dieta contendo 10,0 g kg⁻¹ do prebiótico. Ainda, valores superiormente significantes perante a dieta controle foram descritos em *O. niloticus* alimentadas por dois meses com dieta contendo 2,0 g kg⁻¹ de MOS, sobre os parâmetros peso final, ganho de peso, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência protéica e conversão alimentar (ABU-ELALA; MARZOUK; MOUSTAFA, 2013).

A mortalidade registrada no presente estudo foi relativamente baixa (de 2,47 a 9,85 %) e estatisticamente diferente. Os grupos alimentados com 4,0 e 15,0 g kg⁻¹ de MOS na dieta apresentaram maior porcentagem de sobrevivência, 97,38% e

93,57%, respectivamente. Ainda, pode-se considerar registro de maior mortalidade no grupo alimentado com dieta ausente de mananoligossacarídeo (9,85%).

As condições ambientais de cultivo dos animais, principalmente em peixes, podem afetar diretamente o crescimento e sobrevivência dos mesmos. A porcentagem de sobrevivência é considerada uma variável importante, pelo fato de que um experimento laboratorial mantém condições consideradas ideais de crescimento e sobrevivência dos animais. E, uma diferença na mortalidade registrada, muito provavelmente, será atribuída ao tratamento aplicado. Os resultados de sobrevivência obtidos neste estudo, após 45 dias de alimentação, são considerados como satisfatórios. Na prática, em um ambiente comercial de cultivo, uma melhora na sobrevivência dos peixes, como a registrada neste estudo, pode refletir em maior produtividade.

Os resultados relevantes sobre a sobrevivência neste estudo, podem estar associados à alteração bacteriana ocasionada pelo MOS. Assim como outros oligossacarídeos, ele reduz o crescimento de bactérias no intestino por meio dos ácidos graxos no local, diminuindo assim o pH (CHOI; NAMKUNG; PAIK, 1994; JUSKIEWICZ; ZDUNCZYK; JANKOWSKI, 2004). Essa diminuição nos valores de pH reduz a colonização intestinal de bactérias patogênicas, pois, patógenos oportunistas como *E. coli* e salmonelas, crescem em pH neutro, enquanto o pH baixo pode favorecer o crescimento de bactérias benéficas como lactobacilos (MATHEW et al., 1998). Isso pode refletir em um quadro mais saudável e em maior sobrevivência dos animais.

Comparadas aos resultados descritos neste estudo, na alimentação de carpa (*Cyprinus carpio*) com dietas contendo 1,0 g kg⁻¹, 2,0 g kg⁻¹ e 3,0 g kg⁻¹ de MOS, por 45 dias, mesmo que não influenciada significativamente, foram evidenciadas médias de mortalidade relativamente altas durante o período experimental (controle 36,70%; 1,0 g kg⁻¹ – 30,00%; 2,0 g kg⁻¹ – 33,40%; 3,0 g kg⁻¹ – 31,70%) (AKRAMI et al., 2012b). Com a alimentação de dietas com 0,0, 10,0, 20,0 e 30,0 g kg⁻¹ de mananoligossacarídeo para juvenis de tilápia-do-Nilo, por 53 dias, não foi relatado mortalidade durante o período experimental (SCHWARZ et al., 2010).

No presente estudo como fonte proteica na ração foram utilizados farelo de soja e farinha de peixe, dois produtos frequentemente usados na alimentação para

peixes. O farelo de soja é de fácil obtenção, altamente disponível no mercado nacional, e considerado um alimento de valor nutritivo elevado, como a principal fonte de proteína de origem vegetal (KAUSHIK et al., 1995; EL-SAYED, 1998). Além de ser muito bem aceita e utilizada em aquicultura, a farinha de peixe, é caracterizada como um alimento de alto valor proteico, uma boa fonte de ácidos graxos (EL-SAYED, 1999), de minerais e vitaminas essenciais e energia digestível (TACON, 1993).

Alimentos proteicos utilizados em rações são considerados como a maior na parte dos custos das mesmas quando em piscicultura intensiva e semi-intensiva (BOSCOLO et al., 2001), por isso é importante saber, em determinadas condições, juntamente com outros ingredientes, como estes componentes tão importantes são assimilados por determinada espécie.

Somente a composição química não determina o valor nutricional de um alimento, aliada a isto, está a capacidade de absorção e utilização dos nutrientes e energia pelo peixe (NRC, 1993). Neste estudo determinaram-se os coeficientes de digestibilidade aparente de proteína bruta (CD_{PB}) de tilápias alimentadas com dietas adicionadas de diferentes níveis de MOS. Contudo, não foram observadas diferenças ($p < 0,01$) entre os tratamentos com o mananoligossacarídeo, inclusive perante a dieta controle.

O mananoligossacarídeo é um conhecido ingrediente e considerado importante em utilização nas rações, pois, pode aderir-se às bactérias patogênicas eliminando-as do trato digestório, melhorando a integridade das vilosidades intestinais, favorecendo a multiplicação de bactérias benéficas, aumentando assim, a assimilação de nutrientes e consequentemente a saúde e desempenho do animal. Porém, são muito poucos os estudos sobre a digestibilidade de proteína em peixes alimentados com mananoligossacarídeo.

Sabe-se que polissacarídeos não-amiláceos são os principais componentes da parede celular de levedura (BACH KNUDSEN, 2001), entretanto, a capacidade de aproveitamento destes pela espécie *Oreochromis niloticus*, é considerada ineficiente, podendo os mesmos, ainda, inibir a ação da digestibilidade (BOSCOLO; HAYASHI; MEURER, 2002). Paredes celulares de leveduras espessas que originam o mananoligossacarídeo (até 30% da massa seca total) resultam na resistência à

degradação enzimática no trato gastrointestinal e consequentemente ineficiência na assimilação das dietas (SCHWARZ et al., 2010). 34,7% de massa seca resultam em baixa digestibilidade da parede celular da levedura em juvenis de tilápia-do-Nilo (HISANO et al., 2008).

Pode-se considerar, também, que o peso e comprimento dos peixes podem influenciar na digestibilidade dos nutrientes. Assim, esse efeito sobre a digestibilidade de proteína, possa não ter sido verificado devido à padronização do tamanho inicial dos peixes e também, no tamanho atingido até período estabelecido de fornecimento das dietas ($127,3 \pm 4,79$ g e $18,7 \pm 0,27$ cm no início e $228,46 \pm 15,87$ g e $22,4 \pm 0,8$ cm ao final de 45 dias de alimentação). Trutas (*Oncorhynchus mykiss*) em estágios de crescimento, alimentadas com uma ração padrão tiveram valores variados de coeficiente de digestibilidade aparente de proteína entre grupos de pesos corporais (INABA et al., 1962). Em *Leptobarbus hoevenii* com grupos medindo de 5,0 a 8,0 cm e de 20,0 a 26,0 cm foram constatados maiores coeficientes de digestibilidade aparente em peixes com maiores comprimentos (LAW, 1984). Ainda, tilápias-do-Nilo (25,0; 250,0 e 500,0 g) apresentaram maior aproveitamento dos nutrientes de alimentos de origem vegetal em peixes maiores, enquanto os menores aproveitaram melhor os nutrientes de alimentos de origem animal e inorgânica (QUINTERO-PINTO, 2008).

Como em concordância com os resultados do presente estudo, a utilização de $1,0 \text{ g kg}^{-1}$, $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ e $3,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS na dieta para juvenis de tilápia-do-Nilo não proporcionou melhora na digestibilidade de proteína bruta nos peixes alimentados com estes níveis de MOS e entre a dieta sem o prebiótico (SCHWARZ et al., 2010). Portanto, como há resultados importantes de desempenho produtivo registrados, sugerem-se mais estudos sobre a influência da digestibilidade proteica em peixes alimentados com este prebiótico.

5.3. Resistência à Bactéria

Experimentos utilizando desafios bacterianos são uma boa alternativa para avaliar a saúde do animal e documentar dados referentes à reação de agentes promotores de estresse ou doenças (KIRON, 2012). Em relação a uma infecção,

além das variáveis ambientais e hereditariedade, o estado nutricional pode ser responsável por modular uma resposta no peixe, sendo a verificação da sobrevivência ou condição após a exposição a um patógeno uma forma de creditar uma melhora no estado sistema imunológico do animal (KIRON, 2012).

A utilização de prebióticos deve levar em consideração o tempo de administração, forma e níveis de inclusão para cada espécie e sua eficiência pode ser influenciada pelo tipo de agente patogênico presente no ambiente (SAKAI, 1999).

A taxa de mortalidade, neste estudo, após o desafio bacteriano por co-habitação com a bactéria *Lactococcus garvieae* (Figura 8), não foi diferente ($p>0,05$) entre os vários níveis de suplementação com MOS em cada período de avaliação.

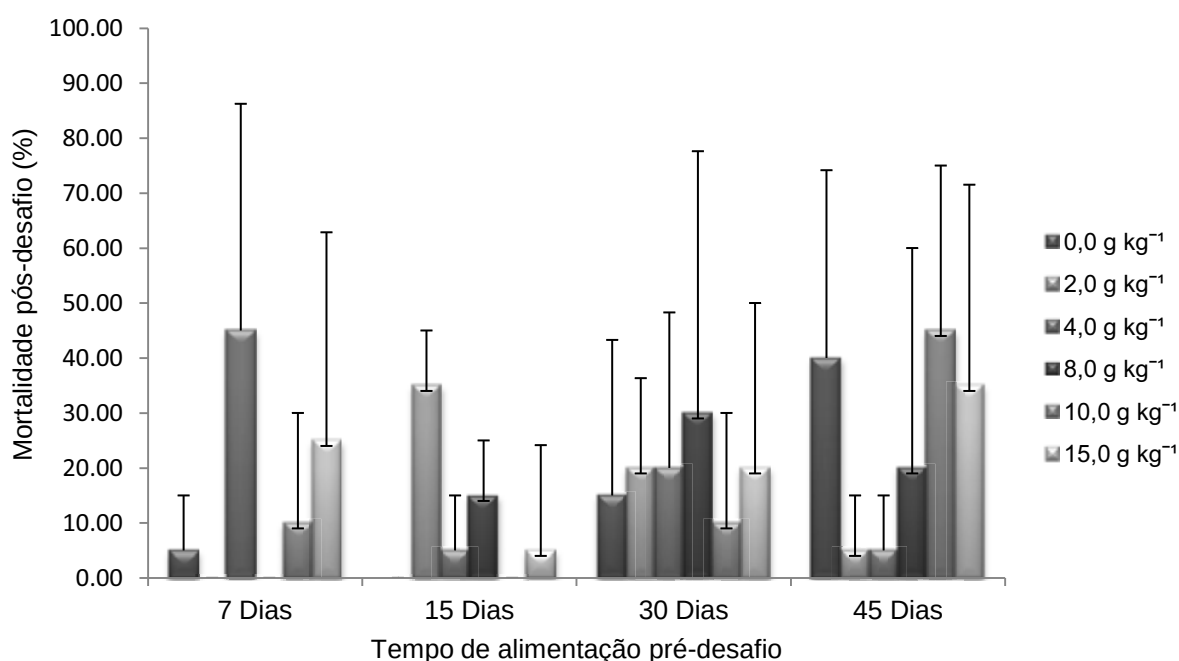


Figura 8. Mortalidade de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após alimentação com mananoligossacarídeo (MOS) em distintos períodos e submissão a desafios com *Lactococcus garvieae*.

Em robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), a suplementação da dieta com 4,0 g kg⁻¹ de MOS, durante 67 dias, seguida de infecção experimental com *Vibrio alginolyticus* proporcionou melhor crescimento dos peixes e melhora do sistema imune, com aumento da resistência à infecção bacteriana (TORRECILLAS et al.,

2007). Ainda para a mesma espécie, outro experimento aplicado por oito semanas com $4,0 \text{ g kg}^{-1}$ de MOS na dieta e posterior submissão ao desafio bacteriano com *Vibrio anguillarum*, foi constatado menor taxa mortalidade (12,5 %) nos peixes alimentados com dieta suplementada em relação ao grupo controle (66, 6%) (TORRECILLAS et al., 2012). Neste estudo, não foi possível estabelecer um nível que proporcionasse menor taxa de mortalidade. Em tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta suplementada com MOS e desafiadas intracelomaticamente com *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens*, e por imersão com *Flavobacterium columnare*, foi observada maior mortalidade nos peixes do grupo controle (70%, 60% e 80%, respectivamente) (ABU-ELALA; MARZOUK; MOUSTAFA, 2013).

A irregularidade apresentada na mortalidade entre os tratamentos deste estudo, por ser explicada pelo fato de que o mananoligossacarídeo tem sua função comprovada na adesão com bactérias gram-negativas que possuem fímbrias do tipo I. Como *L. garvieae* é classificada como uma bactéria gram-positiva, esse efeito direto possa não ter ocorrido. Também como comprovado neste mesmo trabalho, parte do sistema imunológico inato dos peixes, não foi estimulado de forma diferente após alimentação com dietas suplementadas do prebiótico, ficando sua atuação contra o patógeno, teoricamente, menos eficiente e não afetada pelos tratamentos.

Lactococcus garvieae é um agente patogênico emergente, causador de inflamação dos tetos em ruminantes e septicemia em peixes. Evans, Klesius e Shoemaker (2009), pela primeira vez, encontraram evidências da presença de *L. garvieae* em tilápia (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. Com a expansão da piscicultura no país, principalmente da criação de tilápia (*Oreochromis niloticus*), é imprescindível pesquisas que avaliem o impacto de bactérias emergentes na produção.

Atualmente, não são encontrados trabalhos explorando a ação de *L. garvieae* em *Oreochromis niloticus* no território brasileiro.

No presente estudo, mesmo sem apresentar qualquer diferença entre os tratamentos utilizando mananoligossacarídeo, vários peixes desafiados (não-inoculados), apresentaram mortalidade (com média de até 45%) e sinais clínicos característicos da bactéria *Lactococcus garvieae*, como hemorragias (Figura 9),

anorexia, letargia, exoftalmia uni ou bilateral e/ou natação errática (VENDRELL et al., 2006), como também, confirmação da presença do agente patogênico nas amostras de rim e cérebro avaliadas, podendo assim, se destacar, além da carência de trabalhos no país, o possível potencial infeccioso, e a importância de que haja mais estudos utilizando *L. garvieae* em tilápia-do-Nilo.

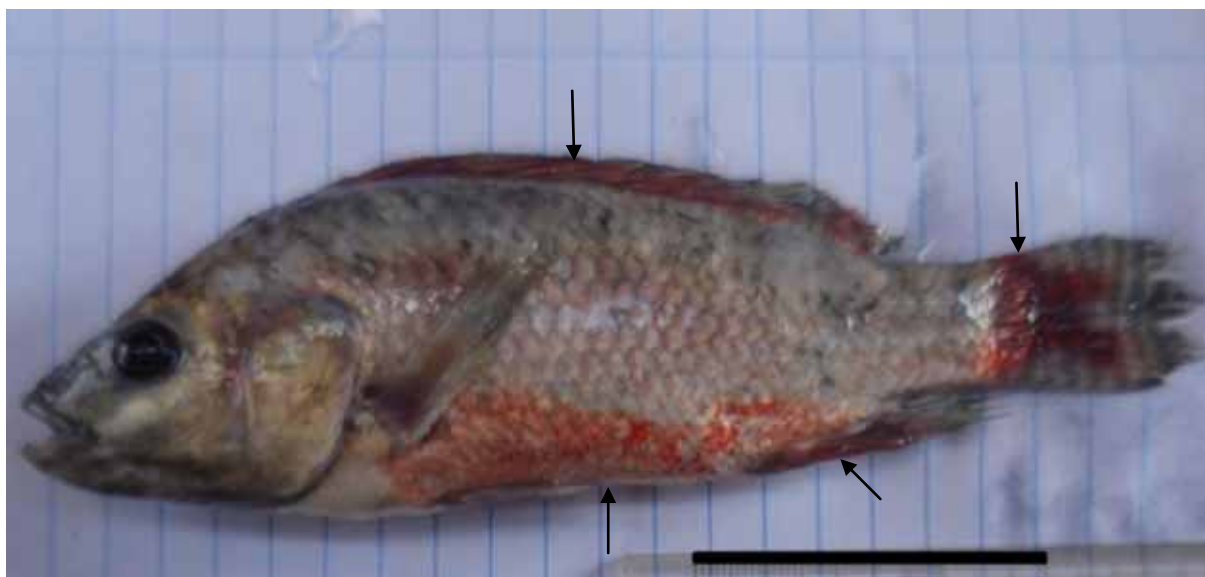


Figura 9. Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após desafio por co-habitação apresentando lesões hemorrágicas (setas) características da bactéria *Lactococcus garvieae*. Barra correspondente à 5,0 cm.

Para fins de comparação sobre a potencialidade da virulência de *L. garvieae*, neste estudo, em todos os períodos em que ocorreram os desafios por co-habitação, independentemente do grupo, já no primeiro dia após a inoculação, peixes não inoculados apresentaram, não somente sinais clínicos, mas também mortalidade. Estudos de inoculação intracelomática realizados com savelhas japonesas (*Seriola quinqueradiata*), mostraram que o período de manifestação da virulência e sinais clínicos da bactéria são curtos, de 2 a 3 dias após a inoculação (ITAMI et al., 1996). Em estudo para truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a inoculação intracelomática de *Lactococcus garvieae* fez com que houvesse o aparecimento de sintomas e mortalidade após 3 dias (MÚZQUIZ et al., 1999). Em inoculação intramuscular em tainha (*Mugil cephalus*) foi verificado aparecimento de sinais clínicos e mortalidade de 100%, 2 dias após a inoculação (CHEN et al., 2002). Surto de *Lactococcus garvieae* afetando o cultivo de truta arco-íris são relatados na África do Sul, Japão,

Austrália, Inglaterra, Taiwan, entre outros países, podendo ocasionar prejuízos com perdas de 50 a 80 % da produção (GHITTINO; PREARO, 1992).

Foi mantido, em todos os desafios realizados, neste estudo, um período de observação de 15 dias, para determinação da mortalidade. Porém, peixes podem não adoecer e morrerem quando submetidos à desafio por um agente estressor. Normalmente, adaptam-se ao agente estressor por um período indeterminado (BARTON; IWAMA, 1991). Peixes hospedeiros que não desenvolvem a doença podem ajudar em sua disseminação (WANG et al., 2007). Em humanos, são descritos muito casos de infecções nos quais *L. garvieae* é o agente causador de endocardite (FURUTAN et al., 1991; LI et al., 2008), osteomielite (JAMES; HARDMAN; PATTERSON, 2000), abscesso hepático (MOFREDJ et al., 2000), septicemia e peritonite, sendo que peixes contaminados podem ser os vetores (WANG et al., 2007). O que também concretiza a grande importância da realização de estudos sobre ação desta bactéria em peixes. E, também, apesar de aparentemente, não influenciada pelos tratamentos com o prebiótico, *L. gravieae* merece maior atenção zootécnica na infecção e mortalidade de *Oreochromis niloticus*.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, nas condições apresentadas, não foi observada influência da suplementação com diferentes níveis de mananoligossacarídeo, perante a dieta isenta do prebiótico, tanto nos parâmetros imunológicos, hematológicos, bioquímicos e na digestibilidade de proteína bruta, quanto na sobrevivência de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após desafio com a bactéria *Lactococcus garvieae*.

A suplementação de 2,0, 4,0 e 8,0 g kg⁻¹ de MOS na dieta melhora ganho de peso da tilápia-do-Nilo.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, J. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009.

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

AFONSO, A.; SILVA, J. C. R.; GOMES, S. ***Lactococcus garvieae* trout infections in Portugal: a new challenge on fish vaccinolog**. Porto: IBMC News, v. 7, 2003. p. 4–6.

AGUIRRE, M.; COLLINS, M, D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 1 p. 95–100, 1993.

AKRAMI, R.; CHITSAZ, H.; HEZARJARIBI, A.; ZIAEI, R. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide (MOS) on Growth Performance and Immune Response of Gibel Carp Juveniles (*Carassius auratus gibelio*). **Journal of Veterinary Advances**, Urmia, v. 2, n. 10, p. 507-513, 2012a.

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

ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J. R.; SUBASINGHE, R. P. (Ed.). **Diseases in Asian aquaculture II**. Manila: Asian Fisheries Society, 1995. p. 185-202.

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

ANDRIGUETO, J. M. **Nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 1999. 395 p.

ANTOLÍN, A.; CIGÜENZA, R.; SALUEÑA, I.; VÁZQUEZ, E.; HERNÁNDEZ, J.; ESPINÓS, D. Liver abscess caused by *Lactococcus lactis* cremoris: a new pathogen. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 36, n. 6–7, p. 490–491, 2004. ARDJOSOEDIRO, I.; RAMNARINE, I. W. The influence of turbidity on growth, feed conversion and survivorship of the Jamaica red tilapia strain. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, p. 159–165, 2002.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish**. 3 ed. Chichester: Springer-Praxis, 1999. 457 p.

AUSTRENG, E. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of gastrointestinal tract. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 13, p. 265–272, 1978.

BACH KNUDSEN, K. E. The nutritional significance of “dietary fiber” analysis. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 3–20, 2001.

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

BASHEERA JOHN, M.; CHANDRAN, M. R.; ARUNA, B. V.; ANBARASU, K. Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunized with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 12, n. 3, p. 201–207, 2002.

BAUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Fimbrial adhesions of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 412, p. 149–158, 1997.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; SABIONI, R. E.; URBINATI, E. C. Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 2, p. 237–24, 2012.

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

BLY, J. E.; CLEM, L. W. Temperature adaptation of lymphocyte function in fish. In: COSSINS, A.R. (Ed.). **Temperature adaptation of biological membranes**, London: Portland Press, 1994. p. 169-184.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; SOARES C. M. Farinhas de peixe, carne e ossos, vísceras e crisálida como atractantes em dietas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, v. 30, n. 5, p. 1397-1402, 2001.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e proteína bruta de alguns alimentos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, v. 31, n. 2, p. 539-545, 2002.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J. O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 20, n. 2, p. 239-262, 2006.

CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity, **Toxicology**, Limerick, v. 180, n. 1, p. 45-63, 2002.

CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Reversão de sexo em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* TREWAVAS, 1983, induzida por 17-alfa-metiltestosterona: proporção de sexo e histologia das gônadas. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 56, n. 2, p. 249-262, 1996.

CASILLAS, E. SMITH, L. S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, London, v. 10, n. 5, p. 481-491, 1977.

CHANG, P. H.; LIN, C. W.; LEE, Y. C. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 319–327, 2002.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C.; VICENTE, E.; DA SILVA, N.; ALVES, A. B.; DE MATTOS, J. A. R. Influência de frações da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre os índices séricos de glicose e lipídios, microbiota intestinal e produção de ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeias curtas de ratos em crescimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 338-348, 2007.

CHEN, S. C.; LIAW L. L.; SU, H. Y.; KO, S. C.; WU, C. Y.; CHAUNG, H. C.; TSAI, Y. H.; YANG, K. L.; CHEN, Y. C.; CHEN, T. H.; LIN, G. R.; CHENG, S. Y.; LIN, Y. D.; LEE, J. L.; LAI, C. C.; WENG, Y. J.; CHU, S. Y. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, p. 727–732, 2002.

CHENG, W.; CHEN, J. C. Effect of cultivation broth pH, temperature and NaCl concentration on virulence of an *Enterococcus*-like bacterium to the giant freshwater prawn. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 36, p. 233–237, 1999.

CHOI, K. H.; NAMKUNG, H.; PAIK, I. K. Effects of dietary fructooligosaccharides on suppression of intestinal colonization of *Salmonella typhimurium* in broiler chicken. **Korean Journal of Animal Science**, Seoul, v. 36, p. 271–284, 1994.

CHOUDHURY, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, S.; DAS, S. S.; MUKHERJEE, S. C. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish Shellfish Immunology**, London, v. 19, n. 3, p. 281–291, 2005.

CLAIRE, M.; HOLLAND, H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 12, n. 5, p. 399–420, 2002.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 50, n. 6, p. 550–552, 1944.

COLLINS, M. D.; FARROW, J. A.; PHILLIPS, B. A.; KANDLER, O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 3427–3431, 1983.

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

DOMÉNECH, A.; PRIETA, J.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; COLLINS, M. D.; JONES, D.; DOMÍNGUEZ, L. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. **Microbiologia**, Madrid, v. 9, p. 63–68, 1993.

ELDAR, A.; GHITTINO, C.; ASANTA, L.; BVOZZETTZ, E.; GORIA, M. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *L. garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology**, New York, v. 32, p. 85–88, 1996.

ELDAR, A.; GHITTINO, C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): similar but different diseases. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 36, 227–231, 1999.

ELLIS, A. E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J. S.; FLETCHER, T. C. ANDERSON, D.P.; ROBERTSON, B.S.; VAN MUISWINKEL, W.B. (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1990. p. 101-104.

EL-SAYED, A. F .M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, Amsterdam, v.179, p. 149-168, 1999.

EL-SAYED, A. F. M. Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), feeds. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, p. 275-280, 1998.

EL-SAYED, A. M.; KAWANNA, M. Effects of photoperiod on the performance of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: I. Growth, feed utilization efficiency and survival of fry and fingerlings. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 231, p. 393–402, 2004.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 32, n. 11, p. 943–951, 2009.

FELDMAN, B. F. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. 1344 p.

FREITAS, J. V. F.; GURGEL, J. J. S. Estudos experimentais sobre a conservação da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L. 1766) Trewavas, armazenada no gelo. **Boletim Técnico do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 153-178, 1984.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 120, p. 235–249, 1983.

FURUKAWA, A.; TSUKAHARA, H. On the acid digestion method for the determination of Chromic Oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. **Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 32, n. 6, p. 502-506, 1976.

FURUTAN, N. P.; BREIMAN, R. F.; FISCHER, M. A.; FACKLAM, R. R. *Lactococcus garvieae* infections in humans: a cause of prosthetic valve endocarditis. In: **91st General Meeting American Society for Microbiology**. Washington, 1991. p. 109.

FURUYA, W. M.; SILVA, L. C.; HAYASHI, C.; FURLAN, A. C.; NEVES, P. R.; BOTARO, D.; SANTOS, V. G. Substituição do milho pela silagem de sorgo com alto e baixo teor de tanino em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 243-247, 2003.

GALL, G. A. E.; BAKAR, Y. Stocking density and tank size in the design of breed improvement programs for body size of tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 173, p. 197–205, 1999.

GALLI, L. F.; TORLONI, C. E. C., **Criação de peixes**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1986. 119 p.

GHITTINO, C.; PREARO, M. Report of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: preliminary note. **Bollettino Societa' Italiana Patologia Ittica**, Padova, v. 8, p. 4–11, 1992.

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

GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S. J.; GLATIN 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. 137-163, 2008.

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

GONÇALVES, E. G. **Determinação do tempo de trânsito gastrointestinal e coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta de uma ração para juvenis de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz,1829)**. 1998. 23 f. Monografia (Graduação em Zootecnia) - Universidade de Marília, Marília, 1998.

GONÇALVES, E. G.; CARNEIRO, D. J. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 779-786, 2003.

HALVER, J. E. **Fish nutrition**. 2. ed. San Diego: Academic Press. 1989. 798 p.

HASSANIEN, H. A.; ELNADY, M.; OBEIDA, A.; ITRIBY, H. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 587-593, 2004.

HIGUERA, M. Diseños y métodos experimentales de evaluación de dietas. In: MONTEROS, J. A. E. DE LOS; LABARTA, M. **Nutrición en Acuicultura II**. Madrid: Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, 1987. p. 291-318.

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

HISANO, H.; SAMPAIO, F. G.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Composição nutricional e digestibilidade aparente da levedura íntegra, da levedura autolisada e da parede celular pela tilápia-do-Nilo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 1, p. 43-49, 2008.

HOLLAND, M. C. H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish immunology**, London, v. 12, p. 399-420, 2002.

HOSHINA, T.; SANO, T.; MORIMOTO, Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish. **Journal of the Tokyo University of Fisheries**, Tokyo, v. 44, p. 57-58, 1958.

HOUGH, J. S. **Biotecnología de la cerveza y de malta**. Zaragoza: Acribia, 1990. 194 p.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. Ed. Sidney: W.W. Lippincott, 1998. p. 1120- 1125.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed). **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 1120-1125.

HUET, M. **Traté de Piscicultura**. 4. ed. Belgium: Editions Charles de Wyngaert. Bruxelles, 1973. 697 p.

HUNTINGFORD, F.; TURNER, A. **Animal Conflict**. New York: Chapman and Hall, 1987. 448 p.

IJI, P. A.; TIVEY, D. R. Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. **World's Poultry Science Journal**. New York, v. 53, p. 351-368, 1998.

INABA, D.; OGINO, C.; TAKAMATSU, C.; SUGANO, S; HATA, H. Digestibility of dietary components in fishes. 1 – Digestibility of dietary proteins and starch in rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Hakodate, v. 28, n. 3, p. 367-371, 1962.

ITAMI, T.; KONDO, M.; SUGANUMA, A.; ABE, T.; NAKAGAWA, A.; SUZUKI, N.; TAKAHASHI, T. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 19, p. 185–187, 1996.

JAFARI, M.; BABOLI, M. J.; ALISHAHI, M. Effects of different levels of Immunoster as prebiotic on some haematological and immunological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). **Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences**, Peshawar, v. 3, n. 10, p. 366-369, 2013.

JAMES, P. R.; HARDMAN, S. M.; PATTERSON, D. L. Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: a first case report. **Postgraduate Medical Journal**, Basingstoke, v. 76, n. 895, p. 301-303, 2000.

JORY, D. E.; ALCESTE, C.; CABRERA, T. R. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte América. **Panorama Acuicola**, Sonora, v. 5, n. 5, p. 50-53, 2000.

JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z.; JANKOWSKI, J. Selected parameters of gastrointestinal tract metabolism of turkeys fed diets with flavomycin and different inulin content. **World Poultry Science Journal**, Auckland, v. 60, n. 2, p. 177-185, 2004.

KANE, E. A.; JACOBSON, W. C.; DAMEWOOD, P. M. JR. Use of radioactive chromium oxide in digestibility determinations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 8, p. 1359-1366, 1959.

KAUSHIK, S. J.; CRAVEDI, J. P.; LALLES, J. P.; SUMPTER, J.; FAUCONNEAU, B.; LAROCHE, M. Partial and total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality In rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 133, p. 257-274, 1995.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 111–133, 2012.

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

KOPPENHEFFER, T. L. Serum complement system of ectothermic vertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 11, p. 279-286, 1987.

KOTB, A. R.; LUCKEY, T. D. Markers in nutrition. **Nutrition Abstracts & Reviews**, Farnham Royal, v. 42, n. 3, p. 813-845, 1972.

KUBTIZA, F.; KUBTIZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 4. ed. Jundiaí: F. Kubitza, 2004. 118 p.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. São Paulo: Degaspari, 2000. 289 p.

KUSUDA, K.; KAWAI, K.; SALATI, F.; BANNER, C. R.; FRYER, J. L. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, p. 406–409, 1991.

LAUE, D.; TUCKER, L. A. **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham University Press: United Kingdom. 2006.

LAW, A. T. Nutritional study of jelewat (*Leptobarbus hoevenii*), fed on pelleted fed. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 41, p. 227-233, 1984.

LEE, D. C.; LEE, J. I.; PARK, C. I.; PARK, S. I. The study on the causal agent of streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fish. **Journal of Fish Pathology**, Nihon Gyobyō Gakkai, v. 14, p. 71–80, 2001.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, New York, v. 10, n. 1, p. 122-129, 2004.

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

LI, W. K.; CHEN, Y. S.; WANN, S. R.; LIU, Y. C.; TSAI, H. C. *Lactococcus garvieae* endocarditis with initial presentation of acute cerebral infarction in a healthy immunocompetent man. **Internal Medicine**, Carlton, v. 47, n. 12, p. 1143-1146, 2008.

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

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; NOMURA, D. T.; FENERICK, J. Resposta ao híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 195-204, 2002.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; POLIZELLO, A. C.; AZZOLINI, A. E.; LUCISANO-VALIM, Y. M. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunological Investigations**, New York, v. 28, n. 2-3, p. 89-101, 1999.

MATHEW, A. G.; CHATTIN, S. E.; ROBBINS, C. M.; GOLDEN, D. A. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 2138–2145, 1998.

MAYNARD, L. A.; LOOSLY, J. K. **Nutrição Animal**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1966. 550 p.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR., C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 343, p. 338–344, 2000.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, R. W. Digestibilidade Aparente de Alguns Alimentos Proteicos pela Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 1801-1809, 2003.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA 2013. 60 p.

MISRA, C. K.; DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; MEHER, P. K. The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish immunology**, London, v. 20, p. 728-738, 2006.

MOFREDJ, A.; BARAKA, D.; KLOETI, G.; DUMONT, J. L. *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immunosuppressed patient. **American Journal of Medicine**, New York, v. 109, n. 6, p. 513-514, 2000.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 343-383.

MÚZQUIZ, J. L.; ROYO, F. M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; RUIZ, I.; ALONSO, J. L. Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence of age of diseased fish. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, Copenhagen, v. 19, p. 114–119, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestic animals**. Washington, 1993. 114 p.

NOSE, T. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). **Bulletin Freshwater Fisheries Research Laboratory**, Tokyo, v. 10, p. 11-22, 1960.

OTERO, M. A.; VASALLO, M. C.; VERDIEIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETANCOURT, D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, London, v. 67, n. 1, p. 67-71, 1996.

OYOFO, B. A.; DELOACH, J. R.; VORRIER, D. E.; NORMAN, J. O.; MOLLENHAUER, H. H. Prevention of *Salmonella thiphimuriun* colonization of broilers with D-manose. **Poultry Science**, Champaign, n. 68, p. 1357-1360, 1989.

PANKHURST, N. W.; DEDUAL, M. Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate, gonadal steroids in a natural population of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 1013-1025, 1994.

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

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Maringá: Eduem, 2008. 311 p.

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

PEREIRA, F.; RAVELO, C.; TORANZO, A. E.; ROMALDE, J. L. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. . **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, Copenhagen, v. 24, n. 6, p. 274–279, 2004.

PLUMB, J. A. Infectious diseases of tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A., RAKOCY, J. E. **Tilapia Aquaculture in the Americas**, vol. 1, Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1997. p. 212– 228.

POLHILL, R. B.; NEWMAN, S. L.; PRUITT, K. M.; JOHNSTON, R. B. Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. 2. Influence of antibody on alternative pathway activation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 121, n. 1, p. 371-376, 1978.

POPMA, T.; MASSER, M. **Tilapia: life history and biology**. Auburn: Auburn University/Southern Regional Aquaculture Center, 1999. p. 1-4. (Publication, 283).

PRIETA, J.; DOMEÉNECH, A. M.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; COLLINS, M. D.; RODRÍGUES, U. M.; JONES, D.; RODRÍGUEZ, A.; DOMÍNGUEZ, L. Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). **Medicina Veterinaria**, Barcelona, v. 10, p. 367–373, 1993.

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.

QUINTERO-PINTO, L. G. **Exigência dietária e disponibilidade de fontes de fósforo para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 85 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade estadual Paulista, Botucatu, 2008.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1. ed. Maringá: Eduem, 2013. 140 p.

RAVELO, C.; MAGARIÑOS, B.; LÓPEZ-ROMALDE, S.; TORANZO, A. E.; ROMALDE, J. L. Molecular fingerprintings of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p.751–756, 2003.

RAZEGHI-MANSOUR, M.; AKRAMI, R.; GHOBADI, S. H.; AMANI-DENJI, K.; EZATRAHIMI, N.; GHARAEI, A. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 38, p. 829–835, 2012.

REBAR, A. H.; MACWILLIAMS, P. S.; FELDMAN, B. F.; METZGER, F. L.; POLLOCK, R. V. H.; ROCHE, J. **Guia de hematologia para cães e gatos**. 1. ed., São Paulo: Roca, 2003. p. 133-156.

RIDLEY, M. **Animal Behavior**. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1995. 288 p.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 5. ed. London: Mosby, 1998. 423 p.

ROMALDE, J. L.; TORANZO, A. E. Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. In: CUNNINGHAM C. (Ed). **Molecular diagnosis of salmonid diseases**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 211–233.

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

RUOFF, K. L.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, B. STREPTOCOCCUS. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1999. p. 282–296.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. **Journal of the world aquaculture society**, Baton Rouge, v. 39, n. 6, p. 821-826, 2008.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, n. 1, p. 63-92, 1999.

SANKARAN, K., GURNANI, S. On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Delhi, v. 9, p. 162-165, 1972.

SASSADA, M.; PABST, M. J.; JOHNSTON, J. R. R.B. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide producing NADPH oxidase. **The Journal of biological chemistry**, Bethesda, v. 258, n. 16, p. 9631–9635, 1983.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, p. 229-239, 2008.

SAVAGE, T. F.; COTTER, P. F.; ZAKRZEWSKA, E. I. The effects of feeding mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, n.1, p. 143, 1996.

SCHLEIFER, K. H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BALZ, R.; COLLINS, M. D.; FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 6, p. 183–195, 1985.

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**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 197-203, 2010.

SCHWARZ, K. K.; FURUYA, W. M.; NATALI, M. R. M.; GUALDEZI, M. C.; LIMA, P. A. G. Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 12, p. 2634-2640, 2011.

SECOMBES, C. J.; FLETCHER, T. C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, Danvers, v. 2, p. 53–71, 1992.

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

SHANE, S. M. Mannan oligosaccharides in poultry nutrition: mechanisms and benefits. **Proceedings of Alltech's Annual Symposium**, Lexington, p. 65-77, 2001.

SHEIKHOLESLAMI-AMIRI, M.; YOUSEFIAN, M.; YAVARI, V.; SAFARI, R.; GHIYASI, M. Evaluation of inulin as prebiotic on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum, 1972) immunity Characteristics and resistance to streptococcus sp infection. **Iranian Journal of Biology**, Tehran, v. 24, n. 2, p. 303–312, 2012.

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

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 58, n. 6, p. 731-736, 1949.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State College, 1974. 593 p.

SOUZA, R. R. P. **Digestibilidade aparente da proteína de dietas para o híbrido de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 1989. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1989.

SOUZA, A. D. L. **Mananoligossacarídeo e B-glucano na suplementação de dietária para juvenis de tilápia-do-nilo mantidos em tanques-rede**. 2010. 52 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella challenged broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 205-211, 2000.

STAYKOV, Y.; DENEV, S.; SPRING, P. Influence of dietary mannan oligosaccharides (BioMos[®]) 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, 2005. p. 431-432. (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**, London, v. 15, n. 2, p. 153-161, 2007.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 29, n. 3, p. 349-364, 1986.

TACON, A. G. J. **Feed ingredients for warmwater fish**: fish meal and other processed feedstuffs. Rome: FAO Fisheries, 1993. 64 p.

TAKEMURA, A.; TAKANO, K. Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties. **Fish physiology and bio-chemistry**, Amsterdam, v. 14, p. 415-421, 1995.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; MORAES, F. R.; CARNEIRO, P. C. F. Physiological response of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 43-48, 2001.

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

THE MERK INDEX. **An incyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 12. ed. Whitehouse Station, NJ: Merk, 1966. 1741 p.

TORANZO, A. E.; DEVESA, S.; HEINEN, P.; RIAZA, A.; NÚÑEZ, S.; BARJA, J. L. Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, Copenhagen, v. 14, p. 19-23, 1994.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M. S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 969-981, 2007.

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**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 591–602, 2012.

TORT, L.; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Imunología**, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2003.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6, p. 171-194.

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; DE BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J. L. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 29, n. 4, p.177–198, 2006.

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; DE BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J. L. Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 80, n. 2-3, p. 222–229, 2007.

VIDAL JUNIOR, M. V. **Técnicas de determinação de digestibilidade e determinação da digestibilidade de nutrientes de alimentos para tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2000. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

WANG, C. Y.; SHIE, H. S.; CHEN, S. C.; HUANG, J. P.; HSIEH, I. C.; WEN, M. S. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. **International Journal of Clinical Practice**, Surrey, v. 61, n. 1, p. 68-73, 2007.

WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia Production systems in the americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, Bethesda, v. 10, n. 3-4, p. 465-498, 2002.

WELLS, R. M.; PANKHURST, N. W. Evaluation of simple instrument for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 30, n. 2, p. 276-283, 1999.

WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. Immune responses 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**, Baton Rouge, v. 38, n. 1, p. 24-35, 2007.

WILLMENT, J. A.; BROW, G. D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 27-32, 2007.

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

YASUI, G. S.; SANTOS, L. C.; SHIMODA, E.; RIBEIRO-FILHO, O. P.; CALADO, L. L.; FREITAS, A. S.; VIDAL, J. R. M. V.; FERREIRA, E. B. Masculinização de três linhagens de tilápias do Nilo utilizando o andrógeno sintético 17- α -metil-testosterona. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 25, n. 4, p. 307-310, 2007.

YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. 1995. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral-administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 195–198, 1995.

ZANIBONI FILHO, E. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. (Ed) **Aquicultura: Experiência Brasileira**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 309-336.

ZAPATA, A. G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p.1-62.

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

ZHU, H.; LIU, H.; YAN, J.; WANG, R.; LIU, L. Effect of yeast polysaccharide on some hematologic parameter and gut morphology in *channel catfish* (*Ictalurus punctatus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 1441-1447, 2012.