

ALLAN DAVID SILVA

RESISTÊNCIA À INFECÇÃO CAUSADA POR *Streptococcus agalactiae* PELA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*), QUANDO ALIMENTADA COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE MINERAIS ORGÂNICOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura

Orientadora: Débora Machado Fracalossi

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Allan David

Resistência à infecção causada por *Streptococcus agalactiae* pela tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), quando alimentada com rações suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos / Allan David Silva ; orientadora, Débora Machado Fracalossi, 2018.

120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Tilápia-do-nilo. 3. Infecção bacteriológica. 4. Estresse oxidativo. 5. Minerais orgânicos. I. Fracalossi, Débora Machado . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Resistência à infecção causada por *Streptococcus agalactiae* pela tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), quando alimentada com rações suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos

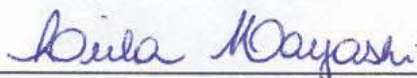
Por

ALLAN DAVID SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



Profa. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura


Banca Examinadora:



Dra. Debora Machado Fracalossi - *Orientadora*



Dr. José Luiz Pedreira Mouriño - UFSC



Dr. Maurício Peña Cunha - UFSC

Este trabalho é dedicado à Esther
David, minha filha.

AGRADECIMENTOS

A minha querida mãe, meu pai e minha esposa por terem me feito chegar até aqui, me transformando no homem que sou hoje;

A minha orientadora, por todas as oportunidades, pela confiança, pelo apoio e por me inspirar a ser cada vez melhor como profissional e como ser humano;

Aos Professores Alcir Luiz Dafre e José Luiz Pedreira Mouriño, por todos os auxílios, explicações e sugestões, que foram muito enriquecedores para este trabalho;

A todos os amigos dos Laboratórios LABNUTRI, LAPAD, NEPAQ e LABDEF, pela ajuda que foi essencial durante a execução deste projeto, além dos momentos de alegria e descontração;

Em especial aos amigos Bruno Pierri e Carlos Arturo pelas horas me auxiliando e, principalmente, pelos conselhos, ensinamentos e amizade;

Ao Gabriel Jesus, pela incrível disposição em me auxiliar e a solucionar problemas durante o experimento;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, por todos os ensinamentos ao longo do curso;

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Carlito Klunk, por sua prestatividade em atender os alunos e pela valiosa ajuda em diversas ocasiões;

À Alltech pelo financiamento do projeto;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos;

A todos que, de alguma forma, contribuíram com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O adequado suprimento de minerais na dieta é essencial para o desenvolvimento do sistema imunológico dos peixes, deixando-os mais aptos para enfrentar enfermidades em sistemas intensivos de criação. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a resistência de juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) à infecção com *Streptococcus agalactiae*, quando alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, na forma do aditivo BIOPLEX-TR-Se-Peixe™, produzido pela empresa Alltech. Além da sobrevivência, foram avaliados o status antioxidante, alterações hematológicas e respostas imunes celulares e humorais não específicas. Trinta e seis grupos de 22 peixes foram alimentados por 56 dias com níveis crescentes (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) do aditivo, contendo os minerais Fe, Cu, Zn, Se e Mn, além de uma dieta suplementada com 100% destes minerais na forma inorgânica. Após o ensaio alimentar, dezoito grupos de dezenove peixes foram inoculados com 5×10^7 unidades formadoras de colônia mL⁻¹ na cavidade intraperitoneal, dose esta previamente estabelecida como suficiente para infectar 50% dos peixes alimentados com ração comercial (DL₅₀). A mortalidade foi avaliada diariamente, a cada 4 h, até 120 h após o desafio. Amostras de sangue e soro foram coletadas antes e 120 h após o desafio, para realização das análises hemato-imunológicas. Já para avaliação do status antioxidante, amostras de sangue e fígado foram coletadas somente 48 h após o desafio. Em geral, as diferentes suplementações minerais testadas não afetaram de forma clara as respostas hemato-imunológicas. Entretanto, a dieta contendo 50% de suplementação na forma orgânica e a dieta contendo 100% da suplementação na forma inorgânica, propiciaram melhora no status antioxidante dos peixes, sendo que a primeira dieta permitiu também maior sobrevivência após o desafio bacteriano. Estas suplementações, por quilograma de ração, foram equivalentes a 18 mg Cu, 223 mg Fe, 53 mg Zn, 21 mg Mn e 0,34 mg Se na dieta com 50% de suplementação na forma orgânica, bem como a 33 mg Cu, 198 mg Fe, 55 mg Zn, 34 mg Mn e 0,70 mg Se na dieta com 100% da suplementação na forma inorgânica.

Palavras-chave: Aquicultura; Tilápia-do-nilo; Infecção bacteriológica; Estresse oxidativo; Minerais orgânicos.

ABSTRACT

The adequate supply of minerals in the diet is essential for the development of the fish's immune system, making them more apt to deal with diseases in intensive breeding systems. The objective of this study was to evaluate the resistance of juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to infection with *Streptococcus agalactiae* when fed diets supplemented with different levels of organic minerals as BIOPLEX-TR-Se-Peixe™, produced by Alltech. In addition to survival, antioxidant status, hematological changes, and non-specific humoral and cellular immune responses were evaluated. Thirty-six groups of 22 fish were fed for 56 days with increasing levels (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) of the additive containing the minerals Fe, Cu, Zn, Se, and Mn, in addition to a diet supplemented with 100% of these minerals in inorganic form. After the feeding trial, eighteen groups of 19 fish were inoculated with 5×10^7 colony forming units mL^{-1} into the intraperitoneal cavity. Such dose was previously established as sufficient to infect 50% of fish fed a commercial diet (LD_{50}). Mortality was assessed daily, every 4 h, up to 120 h after challenge. Samples of blood and serum were collected before and 120 h after the challenge for hemato-immunological analyses. For the evaluation of antioxidant status, blood and liver samples were collected only 48 h after the challenge. In general, the different mineral supplements tested did not clearly affect the hemato-immunological responses. However, the diet containing 50% supplementation in the organic form and the diet containing 100% of the supplementation in the inorganic form, provided an improvement in the antioxidant status of the fish; also, the former diet allowed a higher survival after bacterial challenge. These supplementations were equivalent to 18 mg Cu, 223 mg Fe, 53 mg Zn, 21 mg Mn, and 0.34 mg kg^{-1} in the diet with 50% supplementation in the organic form, as well as 33 mg Cu, 198 mg Fe, 55 mg Zn, 34 mg Mn, and $0.70 \text{ mg kg diet}^{-1}$ in the diet with 100% supplementation in inorganic form.

Keywords: Aquaculture; Nile tilapia; Bacterial infection; Oxidative stress; Organic minerals.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1. Evolução da produção aquícola mundial, de 2010 a 2016. Adaptado de FAO, 2018..... 25
- Figura 2. Evolução da produção de tilápias no Mundo, de 2010 a 2016. Adaptado de: FAO, 2018 27
- Figura 3. Evolução da produção de tilápia no Brasil, de 2013 a 2016, incluindo os cinco maiores estados produtores (em toneladas). Adaptado de: IBGE, 2016 28
- Figura 4. Total da despesca nacional e em Santa Catarina em 2016, espécies com maior expressão, em toneladas. Adaptado de IBGE, 2016..... 29
- Figura 5. Principais doenças que afetam a tilapicultura. Adaptado de WENDOVER (2011) 31
- Figura 6. Formação e metabolismo das principais espécies reativas de oxigênio (vermelho). (Adaptado de PAULSEN; CARROLL, 2013) 40
- Figura 7. Formação e metabolismo de espécies reativas de oxigênio Pelas reações de Fenton e Haber-weiss. (Adaptado de PAULSEN; CARROLL, 2013)..... 40
- Figura 8. Formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e seus efeitos deletérios em biomoléculas (Adaptado de RAMAKRISHNAN; RAJESH; SULOCHANA, 2007) 41
- Figura 9. Representação esquemática de um fagócito envolvendo um micróbio em um vacúolo fagocítico. A NADPH oxidase é ativada seletivamente na parede do vacúolo, gerando O₂ e peróxido de hidrogênio no lúmen vacuolar. Enzimas também são liberadas para o vacúolo por degradação de grânulos citoplasmáticos. Adaptado de SEGAL; ABO (1993)..... 41
- Figura 10. Fatores que influenciam o status nutricional, saúde e funções imunológicas dos peixes. Adaptado de LALL (2000) 42

Figura 11. Reação glutationa: peróxido-hidrogênio oxidoreductase.	51
Figura 12. Reação oxidação do composto I da mieloperoxidase: peróxido de hidrogênio oxidoreductase (formação de hipocloreto)	54
Figura 13. Reação do peróxido de hidrogênio: peróxido de hidrogênio oxidoreductase.....	54
Figura 14. Reação superóxido: superóxido oxidoreductase.....	56

CAPÍTULO I

Figura 1. Desenho esquemático do delineamento utilizado no presente estudo.....	67
Figura 2. Mortalidade cumulativa da tilápia-do-nilo alimentada com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, após desafio bacteriano.....	76
Figura 3. Sinais clínicos observados durante o desafio bacteriano: Peixe 1. Opacidade ocular; Peixe 2. Escurecimento da pele; Peixe 3. Perda de escamas e ascite; Peixe 4. Hemorragia na base da nadadeira peitoral; Peixe 5. Exoftalmia unilateral e ascite; Peixe 6. Necrose da nadadeira peitoral; Peixe 7. Exoftalmia bilateral; Peixes 8 e 9. Hemorragia interna	77
Figura 4. Atividade da mieloperoxidase em amostras de sangue de tilápia-do-nilo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Após uma análise de variância unifatorial, os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS). Os valores são apresentados como média + SEM e as diferenças são indicadas como * ($p < 0,05$) e quando comparados com o grupo 100% inorgânico, sem o grupo PBS, não houve diferenças significativas.....	84
Figura 5. Atividade da enzima catalase em amostras de fígado de tilápia-do-nilo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Após uma análise de variância unifatorial, os valores médios foram comparados com peixes não	

infectados (PBS). Os valores são apresentados como média + SEM e as diferenças são indicadas como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). Quando comparados com o grupo 100% inorgânico, sem o grupo PBS, as diferenças são indicadas como & ($p < 0,05$). A) Atividade na fração citosólica, B) Atividade na fração celular enriquecida em mitocôndrias e peroxissomos e C) Atividade em ambas as frações..... 86

Figura 6. Níveis de glutathiona peroxidase (GPx) (A) e glutathiona total (GSH-t = GSH + GSSH em GSH-equivalentes) (B) em amostras de fígado de tilápia-do-nilo alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Após uma análise de variância unifatorial, os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS). Os valores são apresentados como média \pm SEM e as diferenças são indicadas como ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). Quando comparados com o grupo 100% inorgânico, sem o grupo PBS, as diferenças são indicadas como && ($p < 0,01$)..... 88

Figura 7. Análise de variância do índice de dano oxidativo ao DNA no ensaio Cometa, em eritrócitos em tilápia-do-nilo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS). Os valores são apresentados como média + SEM e as diferenças são indicadas como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) e quando comparados com o grupo 100% inorgânico, sem o grupo PBS, não apresentaram diferenças significativa. 89

Figura 8. Análise de regressão do índice de dano oxidativo ao DNA no ensaio Cometa, em eritrócitos de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com vários níveis de minerais orgânicos, após desafio com *Streptococcus agalactiae*. 90

Figura 9. Análise de variância de Carbonilação de proteínas em amostras de fígado de tilápia-do-nilo alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos (Bioplex), sem suplementação mineral (0%) e com suplementação inorgânica (100% inorgânico), depois da infecção. Após uma análise de variância unifatorial, os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS), e as diferenças estão indicadas como **($p < 0,01$) e, ***($p < 0,001$); ou por & ($p < 0,05$) ou && ($p < 0,01$). Os valores são apresentados como média + SEM.....91

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Estimativa de perdas por doenças em peixes no Brasil. Adaptado de TAVARES-DIAS; MARTINS (2017)..... 31

Tabela 2. Exigências nutricionais de alguns elementos traços para a tilápia-do-nilo 46

CAPÍTULO I

Tabela 1. Formulação da dieta basal utilizada no período de alimentação 66

Tabela 2. Composição das dietas (em matéria seca) 66

Tabela 3. Valores médios do eritograma e proteína plasmática total (PPT) de juvenis de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*..... 78

Tabela 4. Valores médios do eritograma, proteína plasmática total (PPT) e glicose de juvenis de tilápia-do-nilo alimentadas com dietas com 100% orgânico, sem suplementação (0%) e 100% inorgânico, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*. 79

Tabela 5. Valores médios dos parâmetros dos trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e células imaturas de juvenis de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*. 80

Tabela 6. Valores médios dos parâmetros dos trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e células imaturas de juvenis de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*. 81

Tabela 7. Valores médios da proteína sérica total, imunoglobulinas, título de aglutinação e atividade antimicrobiana de juvenis de tilápia-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis

de minerais orgânicos , antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*.....82

Tabela 8. Análise de variância dos valores médios da proteína sérica total, imunoglobulinas (Ig), título de aglutinação e atividade antimicrobiana de juvenis de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com 100% orgânico, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*.82

Tabela 9. Média da atividade da Superóxido dismutase (SOD1, SOD2 e T-SOD) em amostras de fígado de tilápia-do-nilo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção.....85

Tabela 10. ALT e AST do plasma em tilápia-do-nilo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS).....91

LISTA DE QUADROS

INTRODUÇÃO GERAL

Quadro 1. Minerais e algumas de suas funções e sinais de deficiências observadas em peixes. Adaptado de ASHMEAD (1992), LALL (2002), WATANABE (1997) e NRC (2011). 47

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	25
Biologia da tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	26
A importância da tilápia para aquicultura mundial	27
A importância da tilápia-do-nilo na aquicultura brasileira.....	27
As enfermidades na aquicultura	29
As enfermidades na tilapicultura	31
<i>Streptococcus agalactiae</i>	32
Impactos da estreptococcose na tilapicultura	33
Vias de transmissão da estreptococcose.....	33
Fatores de virulência da <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
Sinais clínicos de estreptococcose em peixes.....	35
Imunidade inata (não específica) de peixes.....	36
Nutrição e a sanidade animal na aquicultura.....	42
Biodisponibilidade dos minerais orgânicos ou quelatados.....	47
Microminerais presentes no BIOPLEX-Tr-Se-Peixe™	50
JUSTIFICATIVA.....	58
OBJETIVOS	59
Objetivo Geral.....	59
Objetivos Específicos.....	59
ARTIGO CIENTÍFICO - Resistência à infecção causada por <i>Streptococcus agalactiae</i> pela tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>), quando alimentada com dietas suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos	61
Resumo	62
1. Introdução	63
2. Materiais e métodos	64
2.1. Animais e aclimação	64
2.2. Bactérias e determinação da DL ₅₀	65
2.3. Dietas experimentais	65
2.4. Delineamento do desafio bacteriológico	66
2.5. Amostragem	67
2.6. Parâmetros hemato-imunológicos	68

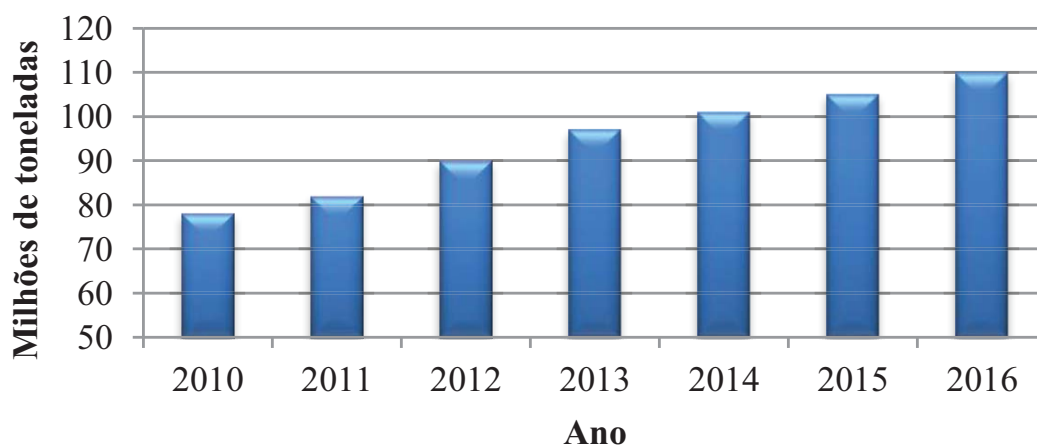
2.6.1. Imunidade celular não específica	68
2.6.1.1. Atividade da mieloperoxidase sérica	69
2.6.2. Imunidade humoral não específica.....	69
2.6.2.1. Proteína sérica total	69
2.6.2.2. Imunoglobulinas	69
2.6.2.3. Atividade aglutinante do soro.....	69
2.6.2.4. Atividade antimicrobiana do soro.....	70
2.7. Parâmetros antioxidantes	70
2.7.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)	71
2.7.2. Atividade da catalase (CAT)	71
2.7.3. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)	71
2.7.4. Níveis de Glutathiona (GSH)	72
2.8. Marcadores de estresse oxidativo	72
2.8.1. Ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE).....	72
2.8.2. Ensaio para determinação dos adutos de carbonilas.....	73
2.9. Marcadores de danos hepáticos	73
2.9.1. Atividade da AST e ALT	73
2.10. Análise dos dados	74
3. Resultados	75
3.1. Mortalidade e sinais clínicos.....	75
3.2. Efeito da infecção nos parâmetros celulares imunológicos não específicas.....	77
3.2.1. Eritrograma	77
3.2.2. Trombograma e Leucograma	79
3.3. Efeito da infecção nos parâmetros humorais não específicas	81
3.4. Efeito da infecção nos parâmetros antioxidativos.....	84
3.4.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)	84
3.4.2. Atividade da catalase (CAT)	85
3.4.3. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)	87
3.5. Marcadores do estresse oxidativo	89
3.5.1. Ensaio Cometa	89
3.5.2. Adutos de carbonila.....	90
3.6. Efeito da infecção nos danos hepáticos.....	91
4. Discussão	92
5. Conclusão	98
6. Referências	99
7. Referências da Introdução Geral	107

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), até 2050, o crescimento da população exigirá um aumento de 70% na produção mundial de alimentos. Isso equivale a mais de 1 bilhão de toneladas de cereais e 200 milhões de toneladas de produtos pecuários produzidos a cada ano (FAO, 2009). Esse quadro representa um grande desafio para alimentar uma população mundial, que deverá chegar a nove bilhões de pessoas até 2050.

Acompanhando tais estimativas, nas últimas cinco décadas, o consumo mundial per capita de peixe aumentou de uma média de 9,9 kg na década de 60 para 14,4 kg na década de 90 e em 2013 apresentou uma média de 19,7 kg (FAO, 2016). De fato, a aquicultura tem se mostrado como forte candidata a suprir boa parte dessa demanda, pois vem se tornando uma importante fonte de produção de alimento, renda e meios de subsistência para centenas de milhões de pessoas ao redor do mundo. A produção de animais aquáticos pela aquicultura mundial em 2016 alcançou 110 milhões de toneladas (Figura 1), tendo a China como o principal produtor, com 57,82% da produção aquícola mundial e o Brasil ocupando a décima quarta posição, representando 0,53%, com 581.230 t produzidas naquele ano. Em relação à piscicultura de água doce, no ano de 2016, a China também ocupou a primeira posição, com a produção de aproximadamente 27 milhões de toneladas, representando 61% da produção de peixes de água doce mundial enquanto o Brasil ocupou a oitava posição, representando 2%, com 505.395 toneladas da produção.

Figura 1. Evolução da produção aquícola mundial, de 2010 a 2016. Adaptado de FAO, 2018.



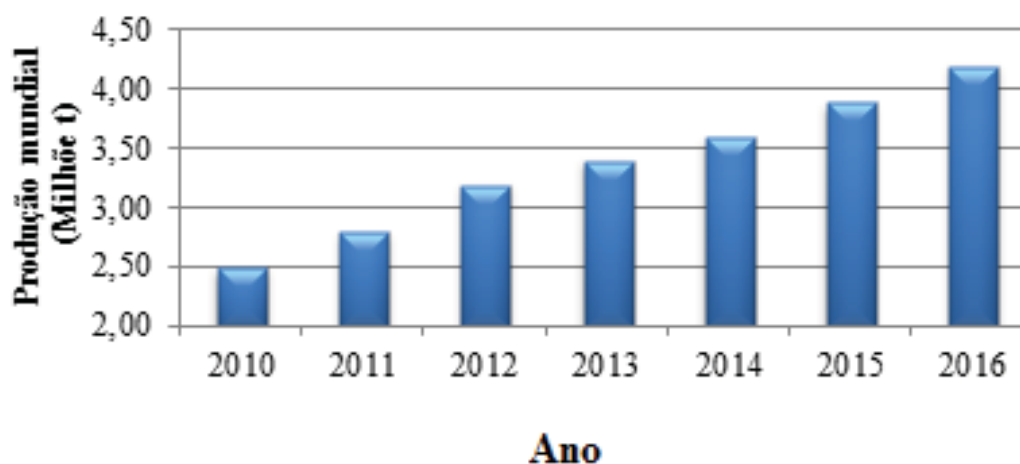
Biologia da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)

A classificação taxonômica do grupo das tilápias pode ser dividida em três gêneros, *Tilapia* (incubação dos ovos no substrato), *Sarotherodon* (incubação dos ovos na boca - materno/paterno) e *Oreochromis* (incubação dos ovos na boca - materno) (EL-SAYED, 2006). Dentre as diversas espécies, apenas três conquistaram destaque na aquicultura mundial: a tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* (objetivo deste estudo); a tilápia azul ou áurea *Oreochromis aureus*; e a tilápia de Mossambique *Oreochromis mossambicus* (KUBITZA, 2006). Um dos principais motivos da contínua expansão da produção desta espécie é baseado na diversidade genética disponível, derivadas de várias espécies do gênero *Oreochromis* (LIPING; FITZSIMMONS, 2011).

A espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) é amplamente distribuída em ecossistemas tropicais, possuindo grande capacidade de inserção e adaptação à diversos tipos de habitat, rápido crescimento, fácil manejo, alto índice de aproveitamento de carcaça e carne de ótima qualidade, com excelente aceitação no mercado. Adapta-se bem a ambientes com baixa qualidade de água, baixas concentrações de oxigênio, grandes variações de pH e altos valores de salinidade (AZEVEDO et al., 2006).

Na natureza, dependendo da espécie, o gênero *Oreochromis* emprega uma variedade de hábitos alimentares, incluindo plâncton, folhas verdes, organismos bênticos, invertebrados aquáticos, larvas de peixes, dentritos e matéria orgânica em decomposição (EL-SAYED, 2006). As tilápias são frequentemente consideradas como filtradoras, pois podem captar eficientemente o plâncton da água. No entanto, a tilápia não filtra fisicamente a água através das brânquias de forma eficiente, como filtradores verdadeiros (algumas espécies de carpa). As brânquias de tilápia secretam um muco que prende o plâncton (SANDERSON et al., 1996). O muco rico em plâncton, ou bolus, é então engolido e a digestão e assimilação dos materiais ocorrem ao longo do intestino (POPMA; MASSER, 1999).

Figura 2. Evolução da produção de tilápias no Mundo, de 2010 a 2016. Adaptado de FAO (2018).



A importância da tilápia para aquicultura mundial

De acordo com a FAO (2016), dentre as espécies cultiváveis, as tilápias (incluindo todas as espécies) representam o segundo grupo mais importante de peixes e são cultivadas em mais de 140 países. Para o departamento de informação e sistema de alerta prévio da FAO (GIEWS), a tilápia é um pilar na segurança alimentar e na nutrição mundial.

Em 2016, a produção mundial de *O. niloticus* totalizou 4,199 milhões de toneladas (Figura 2). A China é, de longe, o maior produtor, consumidor e exportador de tilápia-do-nilo com a produção de aproximadamente 1,4 milhões de toneladas em 2016, que abastece, entre outros mercados, 64% do mercado africano de tilápias congeladas inteiras e 73% do total das importações de tilápia para os EUA. O Egito, Filipinas, e a Indonésia formam junto com a China, os grandes produtores mundiais. O Brasil ocupa, desde 2011, a quinta posição dentre os principais produtores de tilápia do mundo, com 239 mil toneladas (IBGE, 2016; FAO, 2016).

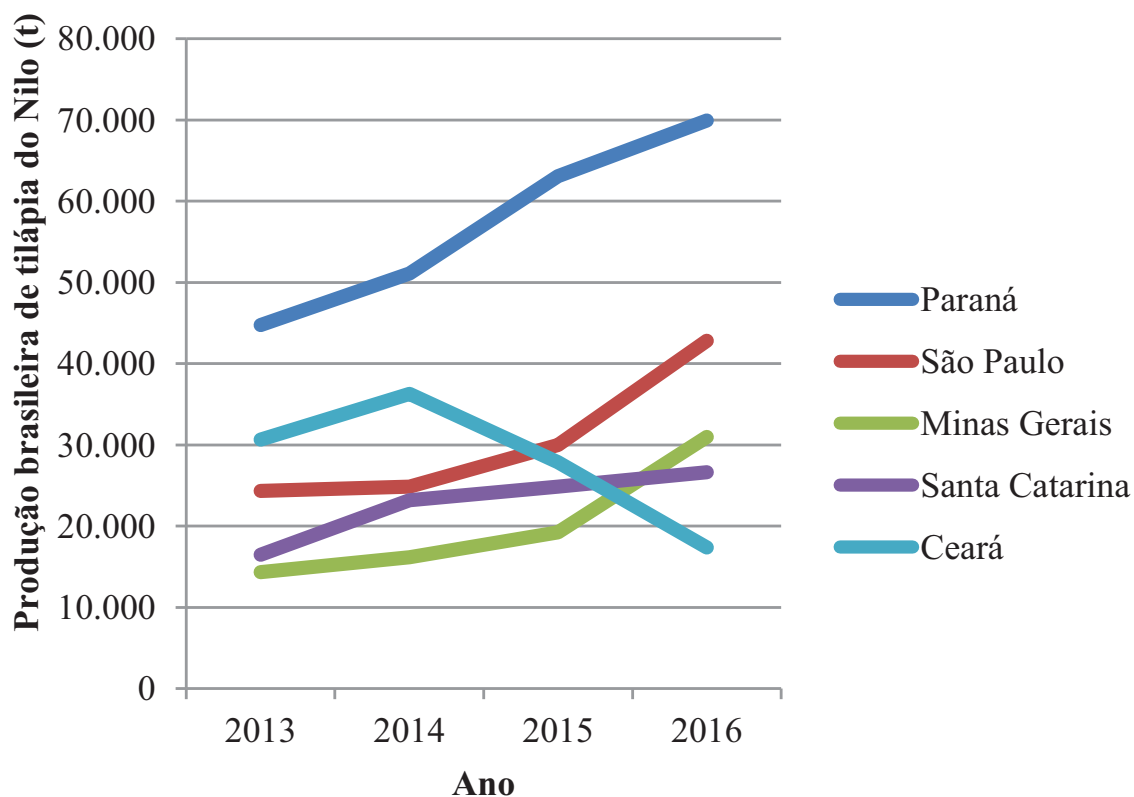
A importância da tilápia-do-nilo na aquicultura brasileira

Em 2013, a aquicultura brasileira foi incluída pela primeira vez no relatório anual de Produção da Pecuária Municipal (PPM), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Desde então, houve um constante crescimento da piscicultura nacional, sendo que a produção total brasileira alcançou 507 mil toneladas, apresentando 9%

de crescimento em relação a 2015 (IBGE, 2016). A tilápia-do-nylo é a espécie mais produzida pela aquicultura nacional.

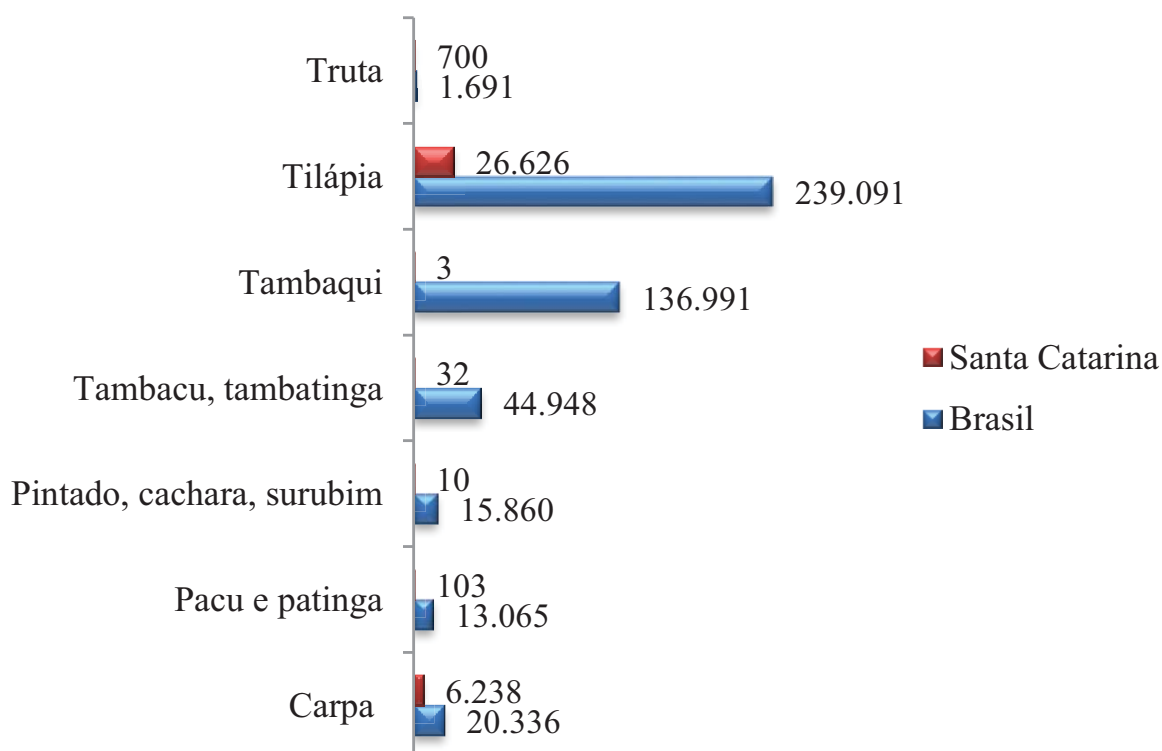
No Brasil, a tilápia-do-nylo (*O. niloticus*) foi introduzida pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) em 1970, com o intuito de proporcionar a produção de alevinos para o povoamento dos reservatórios públicos da região Nordeste e para o fomento da sua criação (FERNANDO KUBITZA, JOÃO LORENA CAMPOS, 2012). Desde então, a espécie tem sido criada em quase todos os polos produtivos nacionais. A produção de tilápia-do-nylo, com aproximadamente 239 mil toneladas, em 2016, representou 47,14 % do total da despesca nacional e crescimento da atividade em quase todos os polos produtivos (Figura 3). Em Santa Catarina (Figura 4), a produção de tilápia representou aproximadamente 79% do total da indústria do estado, no ano de 2016. A produção de tilápia em Santa Catarina representa 11,14 % do cultivo nacional desta espécie.

Figura 3. Evolução da produção de tilápia no Brasil, de 2013 a 2016, incluindo os cinco maiores estados produtores (em toneladas). Adaptado de: IBGE, 2016.



No Brasil, 39,8% das tilápias produzidas, são oriundas de tanques rede, enquanto que 25,5% de tanques escavados (FERNANDO KUBITZA, JOÃO LORENA CAMPOS, 2012). A regulamentação do uso das águas públicas para cultivos intensivos de peixes em tanques-rede impulsiona o cultivo da tilápia, sendo a espécie responsável por aproximadamente 90% das solicitações de áreas aquícolas no País. Com o aumento da tecnificação da produção na tilapicultura nacional é possível o adensamento tanto em tanques rede quanto em tanques escavados, tornado o cultivo cada vez mais intensivo e seguro. No Paraná e Santa Catarina a produção em tanques escavados pulou de 30 para 50 toneladas por hectare. (EMBRAPA, 2017).

Figura 4. Total da despesca nacional e em Santa Catarina em 2016, espécies com maior expressão, em toneladas. Adaptado de IBGE, 2016.



As enfermidades na aquicultura

Apesar do constante crescimento da atividade aquícola no Brasil e no mundo, dos avanços tecnológicos e desenvolvimento de novos sistemas de criação, as perdas durante o ciclo produtivo ainda são significativas. Entre as diversas causas que podem ocasionar perdas em

um cultivo as doenças infecciosas são a principal causa de perda econômica na aquicultura mundial (LOVELL, 1996). Doenças resultam da interação complexa entre hospedeiro, patógeno e meio ambiente, sendo que aspectos relacionados ao manejo produtivo podem contribuir para uma maior suscetibilidade a enfermidades. São eles: 1) altas densidades de estocagem; 2) oscilação da qualidade de água; 3) excesso de matéria orgânica na água, oriundo de arraçoamento em demasia; 4) baixa estabilidade de péletes, aumentando a perda de nutrientes pela lixiviação e 5) deficiências nutricionais, pelo fornecimento de dietas desbalanceadas ou com baixa biodisponibilidade de nutrientes.

Os surtos de doenças estão sendo cada vez mais reconhecidos como uma restrição significativa à produção aquícola, afetando o desenvolvimento econômico do setor em muitos países. Podemos citar a indústria de salmão chilena, a qual ainda se encontra em processo de recuperação de um surto grave do vírus da anemia infecciosa do salmão (ISAV), que começou em 2007, tendo como consequências prejuízos entre 350.000 e 400.000 toneladas de peixe, US\$ 2 bilhões e a extinção de 20 mil empregos. Na China, no início dos anos 90, a perda econômica anual foi estimada em mais de US \$ 120 milhões. A adoção de métodos de controle baseados em pesquisas científicas propiciou a diminuição da perda econômica anual para cerca de US \$ 72,4 milhões (QI, 2002). O Vietnã, por sua vez, relatou perdas médias de US\$ 1 bilhão por ano para patógenos (WORLD BANK GROUP, 2014).

No Brasil, é difícil quantificar adequadamente as perdas causadas por patógenos, devido às dificuldades de obtenção de dados confiáveis. Porém, alguns relatos de mortalidade em pisciculturas, causadas por bacterioses, foram registrados no Brasil (SALVADOR et al., 2003; DUTRA, 2014; BOTELHO et al., 2015; TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017; RAGHIANTE et al., 2017) e demonstram a fragilidade dos ambientes de criação frente à intensificação da produção. Os dados apresentados na tabela 1 relatam uma estimativa de perdas diretas causadas por doenças em peixes no Brasil.

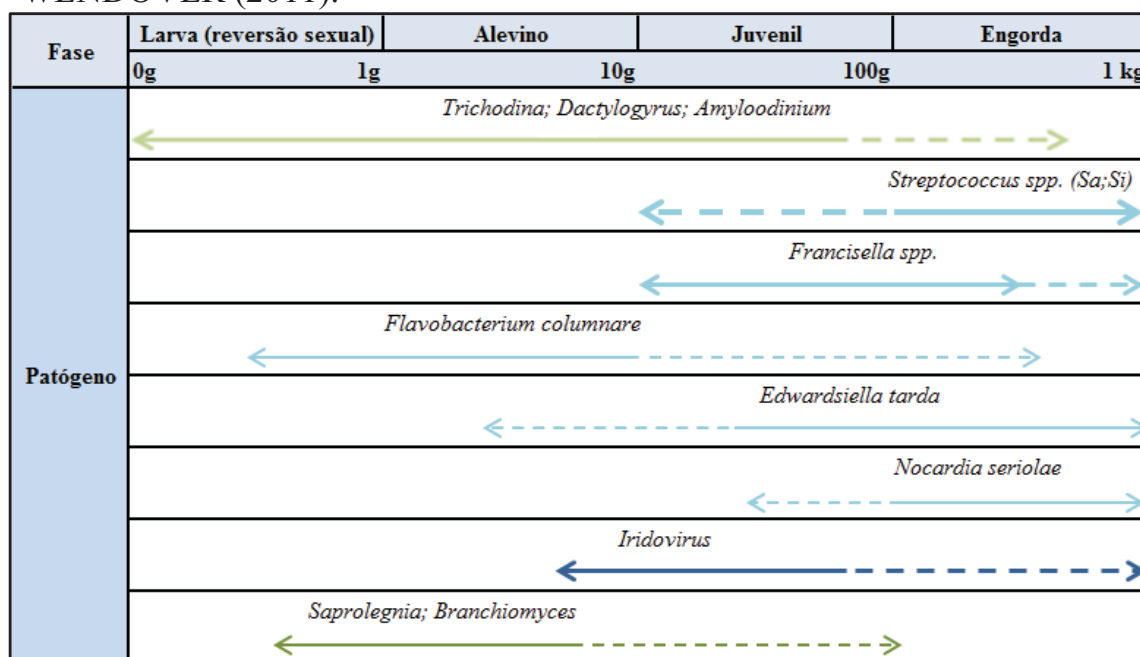
Tabela 1. Estimativa de perdas por doenças em peixes no Brasil. Adaptado de TAVARES-DIAS; MARTINS (2017).

Item	Valor
Área média de cultivo (hectare, bilhões)	2
Densidade de estocagem (peixe por m ²)	5
Número de indivíduos cultivados (bilhões)	10
Preço médio da produção por peixe (US\$)	0.28
Mortalidade média (%)	15
Número total de peixes mortos por ano (milhões)	300
Perda total na produção de peixe por ano (US\$, milhões)	85

As enfermidades na tilapicultura

Na tilapicultura, foram identificadas quatro principais doenças bacterianas, causadas pelos seguintes agentes: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Flavobacterium columnare* e *Francisella spp.*; além de uma doença viral, causada por um iridovírus, e parasitoses causadas principalmente por dois grandes grupos: os monógenos, como *Gyrodactylus* e os protozoários, como *Trichodina* (Figura 5).

Figura 5. Principais doenças que afetam a tilapicultura. Adaptado de WENDOVER (2011).



* A importância da doença é aproximadamente proporcional ao tamanho das barras com as setas.

Dentre aos patógenos bacterianos mais frequentes e de importância econômica no cultivo de tilápias, podemos citar: *Streptococcus sp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium columnare* e *Yersinia ruckeri* (KLESIUS; SHOEMAKER; EVANS, 2008; BHUJEL, 2014).

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae é um patógeno cosmopolita e o principal agente etiológico de septicemia e meningoencefalite em teleósteos (KLESIUS et al., 2006; MIAN et al., 2009; ELDAR et al., 1994, 1995), causando significativa morbidade e mortalidade entre uma variedade de espécies de peixes de água doce e de água salgada em todo o mundo (ROBINSON; MEYER, 1966; PLUMB et al., 1974; EVANS et al., 2002). As infecções podem causar taxas de mortalidade maiores que 50% por um período de 3 a 7 dias. Alguns surtos, no entanto, são de natureza mais crônica, e a mortalidade pode se prolongar por um período de várias semanas, com apenas alguns peixes morrendo a cada dia (YANONG; FRANCIS-FLOYD, 2002). *Streptococcus agalactiae* é uma bactéria catalase negativa, Gram-positiva com formato cocci, podendo ser α -, β - ou não-hemolítica (EVANS et al., 2002).

Ocorre em pares ou cadeias (quando cultivados em meios líquidos), não é móvel e não forma esporos. É facultativamente anaeróbico, requer meios nutricionalmente ricos para o crescimento e geralmente ataca os glóbulos vermelhos, produzindo descoloração esverdeada ao redor das colônias (α -hemólise) ou descoloração completa ao redor das colônias (β -hemólise) ou, ainda, ausência de descoloração (γ -hemólise) no agar sangue (AMAL, 2011). Além disso, é também um tipo de bactéria fermentativa, produzindo principalmente ácido lático, mas sem gás (HOLT et al., 1994).

De acordo com Imperi e colaboradores (2010), esta espécie pode ser subdividida em dez sorotipos (Ia, Ib e II a IX), com base na composição do polissacarídeo capsular. Os sorotipos Ia, Ib e III são os sorotipos mais comuns isolados da tilápia infectada (EVANS et al., 2008; SUANYUK et al., 2008; RODKHUM; KAYANSAMRUAJ; PIRARAT, 2011). No Brasil, foi relatado principalmente o sorotipo Ib, que tem sido predominantemente associado a surtos nas fazendas de peixes (GODOY et al., 2013).

Impactos da estreptococcose na tilapicultura

As perdas estimadas na tilapicultura mundial, causadas por bactérias *Streptococcus sp.*, foram de aproximadamente US\$ 150 milhões em 2000 e aumentaram para US\$ 250 milhões em 2008 (KLESZIUS; SHOEMAKER; EVANS, 2000, 2008). Na China, a estreptococcose causa grandes perdas no mercado de tilápias e o valor das perdas devido às infecções pela bactéria *Streptococcus iniae* é de 23 bilhões de dólares por ano (ZHENG et al., 2017).

Após o primeiro relato em água doce, em 1966 (ROBINSON; MEYER, 1966), a bactéria *S. agalactiae* já foi relatada em peixes de sete países: Estados Unidos, Israel, Japão, Kuwait, Tailândia, Honduras e Brasil (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011). Esta espécie predomina em regiões temperadas e tropicais e também foi isolada de tilápias enfermas na Europa, América Central e do Sul e em toda a Ásia (SHEEHAN, 2010).

No Brasil, o isolamento de *Streptococcus sp.* no norte do estado do Paraná, é uma forte evidência da participação desses agentes na etiologia das septicemias e meningoencefalites em tilápias no Brasil (SALVADOR, et al. 2003, 2005). Também foram relatadas, no município de Paulo Afonso, região norte da Bahia, a sintomatologia clínica da infecção por bactérias *Streptococcus sp.* em tilápias do Nilo [1]. Outros estados produtores, com registros de surtos de mortalidade por *S. agalactiae* foram os estados de Minas Gerais e Espírito Santo (FIGUEIREDO et al., 2006). Durante o período de 2003 a 2007, foram investigados os surtos de meningoencefalite e septicemia causada por *S. agalactiae* na tilapia do Nilo criada em nove diferentes fazendas piscícolas, em seis estados brasileiros (SP, PR, MG, BA, ES e CE), levando a uma mortalidade de mais 70 toneladas neste período (MIAN et al., 2009). Em 2016, foi relatado o primeiro isolamento de *S. agalactiae* em tilapia cultivada no Peru (ORTEGA ASENCIOS et al., 2016).

Vias de transmissão da estreptococcose

A principal via de transmissão, no ambiente de cultivo, é a horizontal (LIM; WEBSTER, 2006), seja pelo contato com peixes e/ou alimentos contaminados, como também pelo contato indireto mediado pela água dos sistemas de criação. O peixe recém-introduzido pode ser o fator mais importante para introdução de *S. agalactiae* ao cultivo. A coabitação de peixes mortos ou infectados com peixes saudáveis resulta

na infecção do peixe saudável, pois as bactérias são excretadas nas fezes dos peixes infectados, sobrevivendo na água e infectando outros peixes saudáveis (NGUYEN; KANAI; YOSHIKOSHI, 2002,).

Além disso, acredita-se que o uso de farinha de peixe infectado no preparo da ração, dependendo do tipo de processamento, seja responsável pelos surtos de estreptococose na Coreia (KIM et al., 2007). Xu, Shoemaker e Klesius (2007) também demonstraram que a infecção por este patógeno poderia ocorrer através de feridas na pele. Este mecanismo geralmente envolveu peixes que foram criados em altas densidades.

Apesar de Jiménez e colaboradores (2011) não detectarem bactérias nas larvas do peixe oriundas de um progenitor infectado, descartando a hipótese de transmissão vertical desta doença, existem estudos recentes que detectaram *S. agalactiae* e *S. iniae* nos órgãos reprodutivos (testículos e ovários), bem como nos ovos fertilizados e alevinos derivados de crias aparentemente saudáveis de híbridos de tilápia-do-nilo e tilápia vermelha (SUEBSING et al., 2013). Pradeep e colaboradores (2016) também encontraram evidências que confirmam que *S. agalactiae* e *S. iniae* podem ser transmitidas verticalmente em tilápia vermelha sob criação intensiva, por peixes assintomáticos infectados. Estes resultados sugerem que a transmissão vertical dessas doenças bacterianas para progênes também pode ser possível para algumas espécies de tilápias.

Fatores de virulência da *Streptococcus agalactiae*

Para que a doença se estabeleça nos peixes, a *S. agalactiae* dispõe de uma série de estratégias para transpor as barreiras físicas do hospedeiro, facilitar sua colonização e assim estabelecer a infecção. Para isto, o microrganismo utiliza estruturas presente em sua superfície ou secreta outras no ambiente circundante.

Além do ataque direto de toxinas formadoras de poros [β -hemolisina/citolisina (β -H/C) e Christie Atkins Munch Peterson (CAMP)] que facilitam a entrada e sobrevivência do patógeno no hospedeiro, é impreterível que o mesmo subverta as defesas imunológicas inatas do hospedeiro. Para esse fim, o patógeno produz fatores de virulência que impedem seu reconhecimento pelo hospedeiro ou fornecem resistência aos mecanismos de defesa (RAJAGOPAL, 2009).

Dentre alguns fatores que proporcionam à *S. agalactiae* a evasão do sistema imune, encontra-se um grupo de enzimas, as

hialuronidases, responsáveis pela degradação de polissacarídeos, principalmente a N-acetilglicosamina, que compõe o ácido hialurônico. A cápsula polissacarídica rica em ácido siálico (CPS) exemplifica o mimetismo molecular, permitindo que o microrganismo invada o hospedeiro sem que seja percebido. Ainda pode-se destacar a resistência do patógeno à espécies reativas de oxigênio, por meio da produção de enzimas superóxido dismutase que tem como cofator o Mn^{+2} , Zn^{+2} e Cu^{+2} .

Para a obtenção de nutrientes vitais à sua sobrevivência, a *S. agalactiae* desenvolveu sistemas de absorção de ferro com alta afinidade, que de forma direta, podem captar o ferro das proteínas especializadas do hospedeiro, tais como a ferritina, transferrina, lactoferrina e hemoglobina (contendo grupo heme), haptoglobulina e hemopexina. Também de forma indireta, podem captar o ferro pelo emprego de hemóforos, especializados na aquisição do grupo heme ou pelo uso de pequenos compostos moleculares chamados sideróforos (normalmente menores que 1 kDa) como quelantes férricos de alta afinidade (RATLEDGE; DOVER, 2000).

Em estudo realizado por MOULIN e colaboradores (2016), foi demonstrado pela primeira vez que o zinco também é essencial para o crescimento ótimo de *S. agalactiae*. Bactérias patogênicas devem se adaptar aos mecanismos de captação de zinco, para acomodar as diferenças de concentrações, distribuição pelo corpo do peixe, tanto para evitar a toxicidade quanto para atender às suas necessidades. Em bactérias, existem várias enzimas importantes que são dependentes de zinco, incluindo a álcool desidrogenase, desacetilase do peptidoglicano, metaloprotease e as proteínas ribossômicas. Os homólogos dessas proteínas estão presentes em *S. agalactiae* e também provavelmente exigem zinco para atividade adequada (RAJAGOPAL, 2009).

Sinais clínicos de estreptococose em peixes

Os principais sinais clínicos causados pela infecção por *Streptococcus sp.* incluem: hemorragias nas brânquias, perda de apetite, deslocamento da coluna vertebral, hemorragias ocular, opacidade da córnea e hemorragias na base das barbatanas e no opérculo. Os sinais mais proeminentes são a exoftalmia unilateral ou bi-lateral e abdômen distendido. Os exames *pos mortem* do peixe afetado revelam a presença de líquido sangrento na cavidade do corpo, baço alargado e avermelhado, fígado pálido e aumentado, bem como inflamações ao redor do coração e rim.

Alguns autores, além de citarem os sinais a cima, também observaram lesões hemorrágicas na pele (YANONG; FLOYD, 2002; SALVADOR et al., 2005; ZAMRI-SAAD; AMAL; SITI-ZAHRAH, 2010). Outros sinais clínicos incluem escurecimento da pele e natação errática, em espiral, ou girando logo abaixo da superfície da água. Em alguns casos, no entanto, os peixes afetados não apresentaram sinais clínicos óbvios antes da morte e a mortalidade deveu-se principalmente à septicemia e infecção do cérebro e do sistema nervoso (YANONG; FLOYD, 2002; ZAMRI-SAAD; AMAL; SITI-ZAHRAH, 2010).

Streptococcus agalactiae pode causar necrose local, invadir e se multiplicar dentro de macrófagos, que podem atuar como veículos, permitindo a invasão da corrente sanguínea, disseminando-a para vários órgãos, inclusive para o encéfalo, pois há transposição da barreira hematoencefálica, caracterizando assim o quadro de septicemia (ELDAR et al., 1994; EVANS et al., 2002). Em indivíduos de tilápia-do-nilo infectados com *S. agalactiae*, o isolamento é mais frequente no encéfalo, rim e fígado em ordem decrescente (FIGUEIREDO, 2006).

Figueiredo (2006) observou o escurecimento dos peixes, exoftalmia bilateral ou unilateral em alguns animais, pequenas lesões de pele com perda de escamas e áreas de petéquias na base das nadadeiras ventrais, natação errática e em movimentos circulares, alta mortalidade e evolução rápida, com morte dois a três dias após o início dos sinais clínicos. Somente animais adultos de ambos os sexos foram acometidos. Por outro lado, recentemente em Guangdong, China, foram relatados casos preocupantes de infecções sem sinais aparentes em tilápias adultas (SUN et al., 2016).

Imunidade inata (não específica) de peixes

Entender o funcionamento do sistema imune de peixes é fundamental para o avanço da aquicultura. Os peixes detêm um sistema de defesa armado com um complexo e extenso número de agentes com a função de prevenir a infecção inicial assim como a multiplicação dos agentes patogênicos após a infecção iniciada. Os peixes possuem tanto um sistema de defesa imune inato (não específico) quanto um adaptativo (específico), sendo que os parâmetros inatos estão na vanguarda da defesa imunológica, podendo ser um fator crucial na resistência às enfermidades.

Além de ser a primeira linha de defesa, o sistema imune inato desempenha um papel essencial na indução e na manipulação da imunidade adaptativa. A resposta adaptativa apesar de ser tipicamente

tardia, não deixa de ser essencial para a imunidade duradoura e é um fator chave na vacinação bem-sucedida (SECOMBES; WANG, 2012). O sistema imunológico inato é um mecanismo de defesa fundamental para o peixe, e também desempenha um papel instrutivo na resposta imune adquirida e na homeostase (MAGNADÓTTIR, 2006).

Magnadóttir (2006) e Whyte (2007) concluem que a resposta inata tem sido considerada um componente essencial na luta contra patógenos em peixes, devido às limitações do seu sistema imune adaptativo, tais como sua natureza ectotérmica, seu limitado repertório de anticorpos e a lenta proliferação, maturação e memória de seus linfócitos. Por outro lado o sistema imune inato também é importante na ativação de uma resposta imune adquirida, e, quanto mais estruturada estiver a imunidade inata, mais rápido irá prover a ativação da imunidade adaptativa, fazendo com que a resposta imunológica do animal funcione de forma sinergicamente mais eficiente.

A imunidade inata dos peixes envolve a barreira epitelial/mucosa, os parâmetros humorais e os componentes celulares. A barreira epitelial/mucosa da pele, das brânquias e do trato digestivo são barreiras extremamente importantes nos peixes, estando constantemente imersas em meios contendo agentes potencialmente nocivos (MAGNADÓTTIR, 2010).

Nos peixes, como nos mamíferos, a inflamação é uma reação protetora do hospedeiro em resposta às lesões, o que resulta em alterações morfológicas e químicas específicas em tecidos e células. Os processos inflamatórios são iniciados se as barreiras da membrana da pele e/ou do muco forem violadas. Uma vez violadas as barreiras físicas, dá-se início à detecção de agentes infecciosos pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (BOLTAÑA et al., 2011).

A existência de múltiplos tipos de PRR, em diferentes compartimentos celulares, alguns dos quais identificam ligantes semelhantes, evidencia as complexidades sinérgicas possíveis nas respostas imunes inatas em um único organismo. Os receptores de reconhecimento de padrões de células hospedeiras agem para detectar e responder aos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Os PAMPs incluem componentes da parede celular bacteriana como lipopolisacarídeos (LPS), peptídeoglicanos e estruturas de DNA ou RNA que são exclusivas das bactérias (BOLTAÑA et al., 2011).

Durante a iniciação da resposta imune inata, acontece a ativação de vias de sinalização celular, induzindo a transcrição de importantes mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas e eicosanóides. As células assassinas naturais (NK)

são estimuladas e, por sua vez, liberam fatores ativadores de macrófagos atraindo os fagócitos para os sites da infecção. Weeks-Perkins e Ellis (1995) estiveram entre os primeiros a demonstrar que os macrófagos de peixe possuem a capacidade de se mover por quimiotaxia ou quimiotaxia em resposta a um antígeno bacteriano *in vitro* ou *in vivo*.

As células imunes não específicas nos peixes consistem em monócitos/macrófagos, neutrófilos (ou granulócitos) e células citotóxicas não específicas ou NK. A ação dos monócitos e/ou macrófagos representa uma das mais importantes respostas imunes, em peixes. São as células primárias envolvidas na fagocitose e na morte de agentes patogênicos após o primeiro reconhecimento e posterior a infecção (SHOEMAKER; KLESIUS; PLUMB, 1997). Os neutrófilos (granulócitos) são as células primárias envolvidas nos estágios iniciais da inflamação (12 a 24 h) nos peixes (MANNING; JOVANOVIĆ, 1985), sendo que a sua função, entre outras, pode estar envolvida na produção de citocinas para recrutar células imunes na área de dano ou infecção (SHOEMAKER; KLESIUS; LIM, 2001).

A migração das células sanguíneas circulantes para os tecidos, para participar da resposta inflamatória, também inclui trombócitos e linfócitos, além de macrófagos e granulócitos (SALVADOR, 2012). O mesmo autor relatou a grande concentração de trombócitos no local da inflamação como normal, já que essas células têm função de defesa em peixes. Em outro estudo, realizado para verificar se dietas suplementadas com extratos naturais poderia influenciar a inflamação aguda e a resposta hematológica em tilapia do Nilo, constatou-se que os macrófagos foram as células mais frequentes, seguidos por neutrófilos, trombócitos e linfócitos (DOTTA et al., 2015).

A fagocitose é o mecanismo de linha de frente pelo qual o sistema imune elimina a maioria dos microorganismos patogênicos, antecede a produção de anticorpos, e mediada por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B e células assassinas naturais (NK) (SECOMBES; FLETCHER, 1992). A fagocitose é um processo mais importante em animais ectotérmicos, já que é o processo imunológico menos influenciado pela temperatura (LANGE; MAGNADOTTIR, 2003).

Segundo Secombes e Fletcher (1992), as principais células envolvidas na fagocitose nos peixes são neutrófilos e macrófagos. Essas células removem as bactérias principalmente pela produção de espécies reativas de oxigênio, pelo complexo NADPH oxidase, durante uma “explosão respiratória” (do inglês “*respiratory burst*”). Além disso, os neutrófilos possuem, em seus grânulos citoplasmáticos, enzimas com

atividade de peroxidase, a mieloperoxidase que, na presença de haleto e peróxido de hidrogênio, matam bactérias pela halogenação da parede celular bacteriana (URIBE et al., 2011). Além disso, essas células possuem lisozimas e outras enzimas hidrolíticas em seus lisossomas (FISCHER et al., 2006). Da mesma forma, os macrófagos podem produzir óxido nítrico, peroxinitritos e grupos hidroxila, que podem ser potentes como agentes antibacterianos (SECOMBES; FLETCHER, 1992). A produção de oxigênio reativo e nitrogênios intermediários por estas células representa um potente mecanismo citotóxico contra bactérias e protozoários patogênicos.

O oxigênio consumido na fagocitose tem sido alvo de estudos nas últimas décadas. Ao investigar a fagocitose de bacilos tuberculosos por neutrófilos e monócitos em 1959, Sbarra e Karnovsky observaram que o aumento súbito no consumo de oxigênio pelos fagócitos era resistente a inibidores como azida e cianeto. Os autores sugeriram que essa explosão respiratória estivesse envolvida em algum processo, além da produção da energia que era necessária para internalização do microrganismo, a qual é fornecida normalmente pela glicólise.

Os processos do sistema imunológico geram espécies reativas de oxigênio (ERO), os quais distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$); e os não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, todos considerados quimicamente reativos para diferentes alvos biológicos. O superóxido é produzido pela redução monoelétrica do oxigênio molecular. A dismutação superóxido pode ocorrer espontaneamente ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) levando à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser degradado em água pelas peroxidases. O H_2O_2 pode gerar radical hidroxila em uma reação catalisada por ferro ou cobre (reação de Fenton). Após a participação na reação de Fenton, o ferro férrico pode ser reduzido por um radical superóxido, contribuindo assim para a formação do radical hidroxila (reação de Haber-Weiss).

Figura 6. Formação e metabolismo das principais espécies reativas de oxigênio (vermelho). (Adaptado de PAULSEN; CARROLL, 2013).

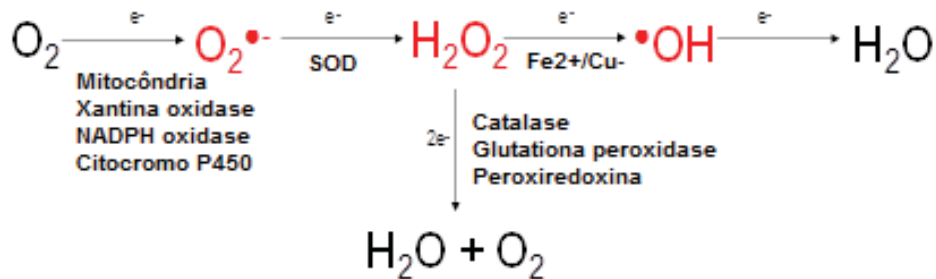
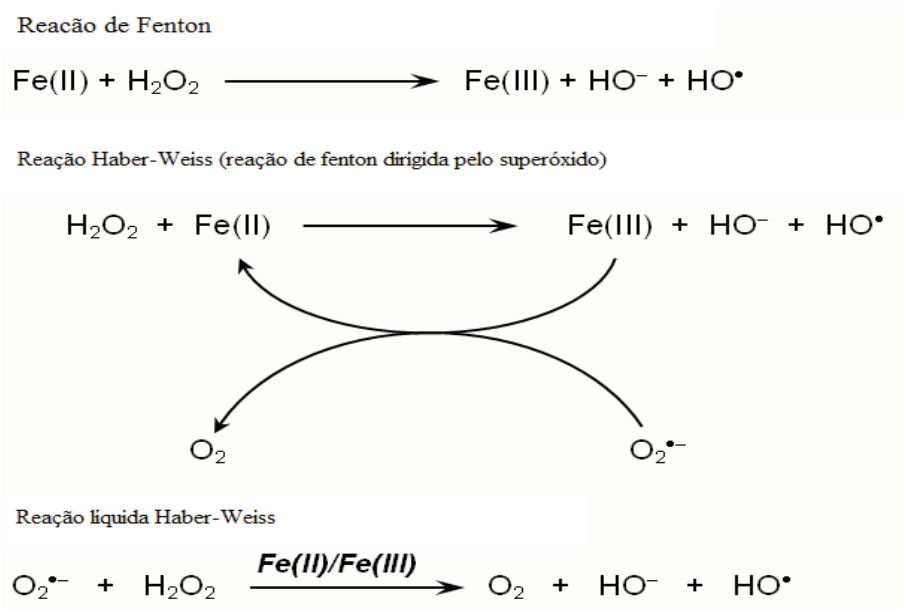
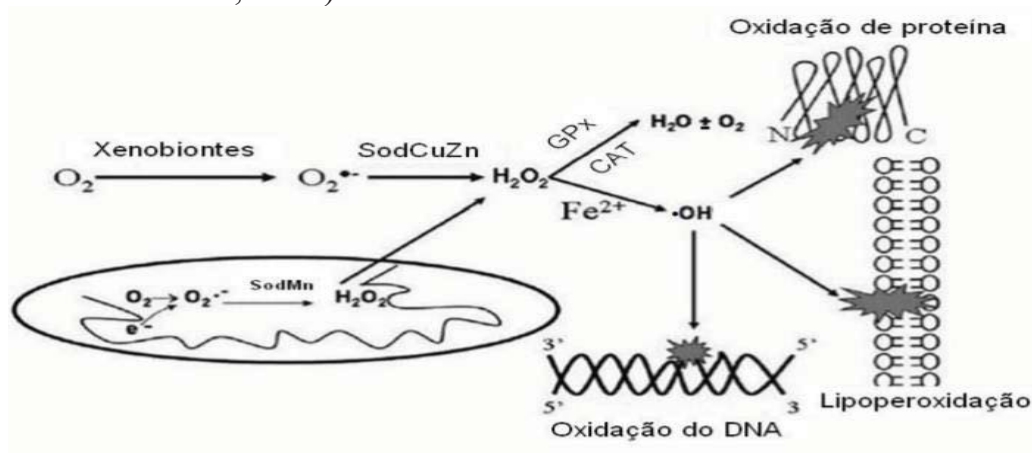


Figura 7. Formação e metabolismo de espécies reativas de oxigênio Pelas reações de Fenton e Haber-weiss. (Adaptado de PAULSEN; CARROLL, 2013)



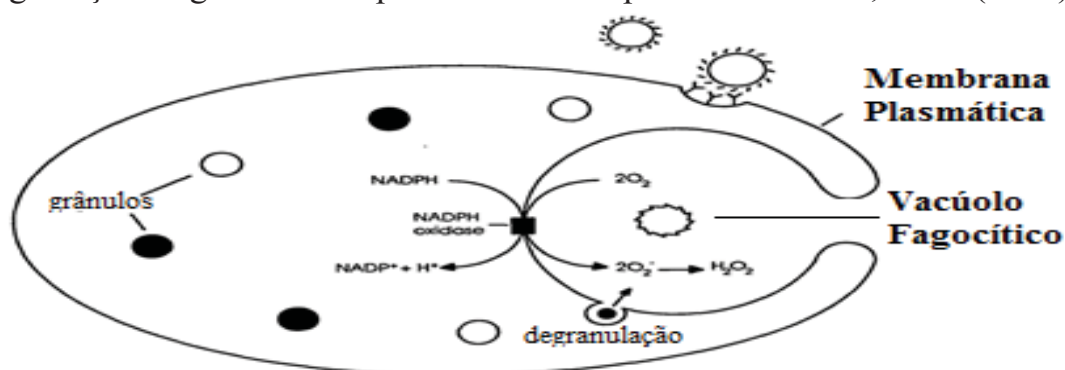
As espécies reativas de oxigênio (ERO), quando presentes em níveis elevados, causado por sua excessiva formação e/ou ineficiência em sua interceptação pelas defesas antioxidantes, são consideradas subprodutos citotóxicos nocivos, capazes de danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos do hospedeiro (Figura 8), prejudicando o funcionamento celular (SIES et al., 2017).

Figura 8. Formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e seus efeitos deletérios em biomoléculas (Adaptado de RAMAKRISHNAN; RAJESH; SULOCHANA, 2007).



No entanto, quando adequadamente equilibrados, algumas formas de ERO, nos fagócitos, desempenham papéis críticos na atividade microbicida, através da sinalização intracelular para ativação e diferenciação adequadas e para comunicação célula-célula (MCCORD, 2000). O superóxido e peróxido de hidrogênio são ERO altamente tóxicos e formam a base de um potente sistema antibacteriano (KLEBANOFF, 1999). Apesar de não serem necessariamente obrigatórios para a fagocitose *per se*, sua presença é vital para a morte efetiva e a digestão de agentes patogênicos.

Figura 9. Representação esquemática de um fagócito envolvendo um micróbio em um vacúolo fagocítico. A NADPH oxidase é ativada seletivamente na parede do vacúolo, gerando O_2 e peróxido de hidrogênio no lúmen vacuolar. Enzimas também são liberadas para o vacúolo por degradação de grânulos citoplasmáticos. Adaptado de SEGAL; ABO (1993).



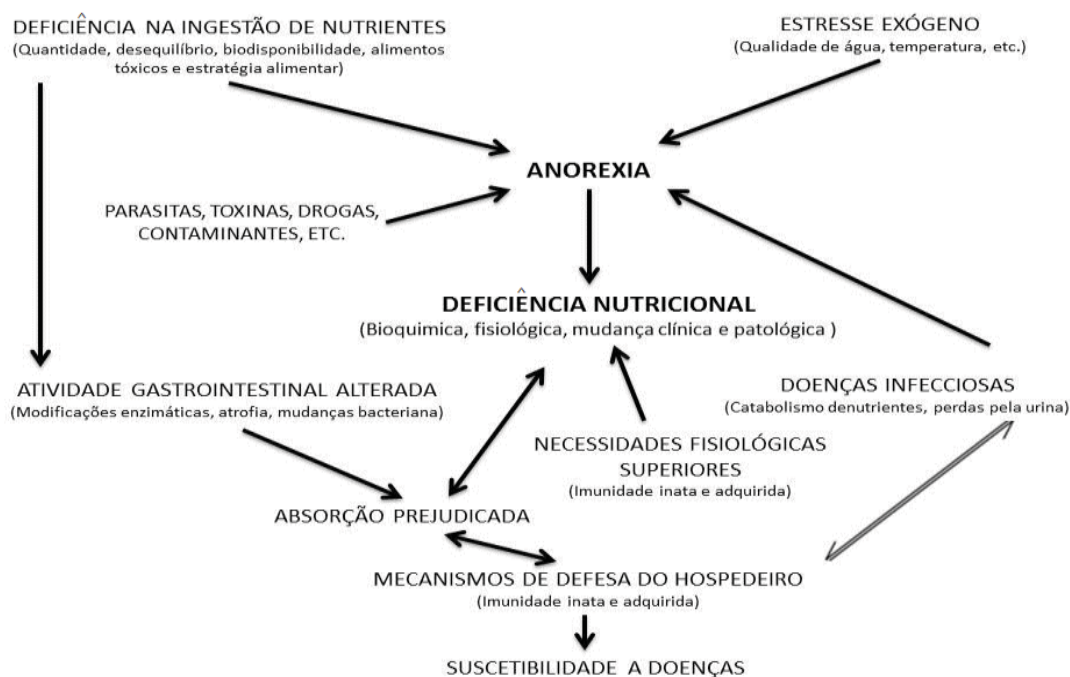
O complexo NADPH oxidase é uma cadeia de transporte de elétrons, encontrada em linfócitos e na parede de vacúolos endocíticos de células fagocíticas. Este complexo é usado como um doador de

elétrons para reduzir oxigênio para superóxido e peróxido de hidrogênio (SEGAL; ABO 1993). Baixa atividade de enzimas responsáveis pela regulação do estresse oxidativo como GPXs, TRs e outras reguladoras de ERO nessas células, podem causar indução a oxidação e morte dos fagócitos. Porém, a superexpressão ou a baixa atividade regulatória pode levar a uma insuficiente produção de ERO, necessárias para a eficiência de outras funções incluindo as fagocitárias.

Nutrição e a sanidade animal na aquicultura

Nas últimas três décadas, foram feitos avanços significativos no estabelecimento das exigências de diversos nutrientes essenciais para o melhor crescimento e melhor utilização dos alimentos, bem como para evitar doenças nutricionais em peixes (NRC, 2011). Porém, mais estudos sobre as exigências dos micronutrientes e suas interações precisam ser conduzidos para que níveis adequados possam ser utilizados como indicadores de estado de saúde, incluindo respostas imunes e resistência a doenças. Dentre os diversos agentes estressores que podem desencadear surto de algumas doenças a redução ou a privação de nutrientes na dieta pode ser o mais preponderante. Um peixe bem nutrido pode resistir a doenças “comuns” dos ambientes de cultivos (Figura 10).

Figura 10. Fatores que influenciam o status nutricional, saúde e funções imunológicas dos peixes. Adaptado de LALL (2000).



De acordo com Lall (2000), a manipulação nutricional pode conferir aos peixes resistência às doenças infecciosas. Para tal, deve haver um equilíbrio adequado entre os macros e os micronutrientes, sendo este estado essencial para o desenvolvimento do sistema imunológico a partir do estágio larval. A dieta apropriada colabora diretamente na preservação da saúde de um animal e na manutenção de sua capacidade de resistir a doenças (LALL; OLIVIER, 1993). Diversos nutrientes podem alterar a resposta imune, agindo sobre as células, direta ou indiretamente, por meio de caminhos metabólicos, neurológicos ou endócrinos (REDDY; FREY, 1902). Taniguchi (1983) relata que a qualidade geral da dieta e o método de armazenamento de ração influenciaram na resistência do yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) à estreptococcose.

As medidas sanitárias primárias utilizadas para reduzir o dano causado por *S. agalactiae* em peixes, incluem um número limitado de antibióticos e quimioterapêuticos de uso aprovados. O tratamento através da vacinação é um método muito difundido e eficaz em muitas situações, sendo a medida mais importante para o controle da estreptococcose nos peixes (LIU et al., 2016). Apesar de tal premissa, de acordo com Gudding e colaboradores (1999), a maioria das vacinas utilizadas na aquicultura tem sido desenvolvida de forma empírica, sendo necessário diagnósticos eficientes para direcionar ações quimioterápicas à sorotipos e perfis genéticos das cepas existentes no país.

Quando mal desenvolvidas, as medidas sanitárias podem contribuir para o surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos em ambientes aquáticos e ter consequências imprevisíveis. No Brasil, apenas os sorotipos Ib e Ia têm sido implicados na doença dos peixes até agora, sendo Ia raro e, de acordo com Chideroli e colaboradores (2017), foram encontradas diferentes susceptibilidades a agentes antimicrobianos de cepas isoladas de *S. agalactiae* de tilápia-do-nilo. Na China, cepas de *S. agalactiae* isoladas de peixes, se mostraram, resistentes à penicilina, ceftriaxona e clindamicina (CHU et al., 2016), o que pode vir a ser resultado da administração inadequada desses produtos.

Outro fator negativo relacionado ao uso de antibióticos, principalmente na ração, citado como uma das recomendações da FAO, é que, dependendo do grau de infestação, os peixes cessam a alimentação, tornando o tratamento ineficiente. Por outro lado, diversos estudos, citados em uma revisão de Awad e Awaad, 2017 (2017), vêm

buscando novas fontes de dietas imunopromotoras por meio da adição de fitoterápicos, com o objetivo de minimizar uma ameaça potencial para a segurança alimentar.

O papel da nutrição vai muito além da busca por maior crescimento dos peixes. A nutrição tem como um dos seus objetivos principais proporcionar a melhoria das respostas aos desafios ambientais das espécies sujeitas à criação intensiva, atendendo o desempenho zootécnico e ao mesmo tempo tornando-as mais resistentes ao estresse causado pela criação intensiva. Para isso, estudos que testam nutrientes funcionais, incluindo muitos oligoelementos, têm sido relatados nos últimos tempos, com o objetivo de compreender como tais nutrientes afetam o sistema imunológico do hospedeiro e seus mecanismos de defesa (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; PARIPATANANONT; LOVELL, 1997; LALL, 2000; LIM; KLESIUS; DUNCAN, 2011).

Dentro do grupo dos oligoelementos, os minerais exercem papel fundamental para o desenvolvimento e saúde dos animais. Segundo Mertz (1956), para ser considerado essencial, um elemento deve apresentar as seguintes características: 1) estar presente em todos os tecidos saudáveis; 2) apresentar concentração similar de um animal para o outro; 3) quando deficiente no organismo, resultar em anormalidades fisiológicas, estruturais e reprodutíveis; 4) sua adição impede ou reverte tais anormalidades. Além disso, as anormalidades induzidas pela deficiência devem ser acompanhadas de mudanças bioquímicas específicas, as quais podem ser curadas ou prevenidas com a adição do elemento em questão. Estudos sobre micronutrientes, como os minerais, são escassos se comparados àqueles sobre macronutriente. No entanto, existem informações gerais sobre nutrição mineral, como exigências ou sinais clínicos de deficiência, as quais foram revisadas em vários livros e artigos (HILTON, 1989; WATANABE et al., 1997; GATLIN, 2001; LALL, 2007; NRC, 2011).

Minerais são elementos inorgânicos necessários para os processos vitais, sendo imprescindíveis para bons índices zootécnicos e saúde dos peixes. Por outro lado, se forem ingeridos e assimilados em quantidades excessivas, podem resultar em toxicidade. Portanto, o animal mantém um delicado equilíbrio dos níveis corporais dos metais traços, integrando os vários parâmetros de absorção, armazenamento e excreção (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997).

Os peixes podem absorver esses tais elementos da dieta e também da água. O cálcio, ferro e inúmeros minerais podem ser absorvidos por meio das brânquias, bem como do intestino, porém a maior parte dos minerais é adquirida através da dieta (WATANABE; KIRON; SATOH,

1997). A troca de íons com ambiente aquático, como descrito por Watanabe, Kiron e Satoh (1997), dificulta a determinação das exigências diárias. Além disso, muitos elementos são necessários, em quantidades tão pequenas, que é difícil formular dietas purificadas e mantê-las livre do elemento testado (LALL, 2000). Porém, a suplementação dietética com certos minerais em níveis acima dos exigidos para o crescimento normal e abaixo daquele que causa toxicidade pode aumentar a função imunológica e a resistência à doenças em peixes. (GATLIN, 2001; LIM et al. 2008a, 2008b).

Com base em exigências nutricionais relativas, os minerais são classificados em dois grupos: macro e microminerais. Os macrominerais são elementos necessários em grandes quantidades (de alguns décimos de grama a mais de um grama por quilo). Pertencem ao grupo dos macrominerais o cálcio, cloro, magnésio, potássio, sódio e o fósforo. Já os microminerais como o cobre, zinco, manganês, ferro e selênio (Tabela 2) são exigidos em quantidades muito pequenas (de microgramas a miligramas por quilo) (NRC,2011).

Algumas funções gerais dos minerais incluem: construir o sistema esquelético, servir como componentes de compostos orgânicos (como proteínas e lipídios), manter o balanço ácido base e osmótico e atuar como cofatores enzimáticos. A deficiência de minerais podem causar patologias bioquímicas, estruturais e funcionais, as quais dependem de vários fatores, incluindo a duração e o grau de privação mineral. O quadro 1 resume as enzimas das quais alguns microminerais fazem parte, suas funções e sinais de deficiência do mineral.

Tabela 2. Exigências nutricionais de alguns elementos traços para a tilápia-do-nylo

Mineral	Espécie	Peso inicial (g)	Fonte do mineral	Fonte proteica (% proteína)	Mineral na água ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exigência do mineral (mg/kg)	Variável determinante	Referência
Zinco	<i>O. niloticus</i>	8,4	ZnSO ₄	EA (30 PB)	15	30	Ganho de peso, EA, CS, CO	Eid; Ghonim (1994)
	<i>O. niloticus</i>	13,3	ZnSO ₄	SBM (30 PD)	7,95	79,51	CO	Sá et al. (2004)
Manganês	<i>O. niloticus</i> x <i>O. áureas</i>	0,64	MnSO ₄	CS (37,5)	1	7	Ganho de peso, EA, AEHep	Lin et al (2008)
Ferro	<i>O. niloticus</i> x <i>O. áureas</i>	0,63	FeSO ₄	CS (38)	1,1	85	Ganho de peso, AEHep, H	Shiau; Su (2003)
	<i>O. niloticus</i> x <i>O. áureas</i>	0,64	FeC ₆ H ₅ O ₇	CS (38)	1,1	150 - 160	Ganho de peso, AEHep, H	
	<i>O. niloticus</i>	2	CuSO ₄	EA (27,80)	NI	4	Ganho de peso, EA, H	Emerson et al. (2004)
Cobre	<i>O. niloticus</i> x <i>O. áureas</i>	0,79	CuSO ₄	CS (34,5)	NI	4	Ganho de peso, H, EA, R, AEPla (ceruroplasma)	Shiau; Ning (2003)
Selênio	<i>O. niloticus</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Fonte proteica: CS – caseína; SBM – farinha de soja; EA – farinha de ovo branco; PB – proteína bruta; PD – proteína digestível. Variável determinante: AEPla - atividade enzimática no plasma; AEHep - atividade enzimática hepática; EA - eficiência alimentar; CS - concentração sérica; CO - concentração óssea; H - parâmetros hematológicos; R - retenção mineral no corpo.

NI - não informado

NT - não testado

Quadro 1. Minerais e algumas de suas funções e sinais de deficiências observadas em peixes. Adaptado de ASHMEAD (1992), LALL (2002), WATANABE (1997) e NRC (2011).

Mineral	Enzima	Função	Sinais de deficiência
Zinco	Anidrase carbônica, álcool desidrogenase e fosfatase alcalina	Formação de CO ₂ , metabolismo do álcool e hidrólise de ésteres fosfatados	Crescimento reduzido, anorexia, catarata, nanismo, depressão da resposta imune e erosões nas nadadeiras e pele.
Manganês	Piruvato carboxilase e Superóxido dismutase (SOD)	Metabolismo do piruvato e dismutação do radical livre superóxido	Redução do crescimento, deformidades na estrutura óssea e catarata
Ferro	Succinato desidrogenase, citocromo (a, b, c), catalase	Oxidação aeróbica de carboidratos, transferência de elétrons e proteção contra peróxidos	Crescimento reduzido, baixa conversão alimentar e anemia
Cobre	Citocromo oxidase e SOD	Oxidase terminal e dismutação do radical livre superóxido	Crescimento reduzido, atividade reduzida da SOD e citocromo oxidase, catarata e erosões nas nadadeiras
Selênio	Glutationa peroxidase (GPx)	Remoção de peróxidos	Crescimento reduzido, catarata e atividade reduzida da GPx, distrofia muscular nutricional e diátese exsudativa.

Biodisponibilidade dos minerais orgânicos ou quelatados

Existe uma grande variação na composição mineral dos ingredientes usados para elaboração de dietas comerciais. Estudos de nutrição animal demonstraram claramente que a biodisponibilidade de um elemento difere sendo fornecido por diferentes alimentos e composições dietéticas (MCDOWELL, 2003).

O caráter bioquímico, ou seja, a forma estrutural que o mineral é oferecido na dieta determinará sua efetividade na sua função nutricional, sendo que o processamento da dieta e fatores antinutricionais possam interferir na estabilidade e disponibilidade desses minerais (ASHMEAD, 1992; WANG; LOVELL, 1997). Assim, os níveis suplementares ótimos destes devem ser estabelecidos de acordo com sua estabilidade e disponibilidade. Tradicionalmente, a suplementação de microminerais na dieta é realizada por meio da inclusão de sais inorgânicos, como carbonatos e sulfatos; porém, estas fontes possuem baixa biodisponibilidade (APINES-AMAR et al., 2004). A biodisponibilidade pode ser compreendida como a proporção de um nutriente que é absorvido, metabolizado e transformado em formas biologicamente ativas ou formas de armazenamento (MUTANEN, 1986). Os fatores que influenciam a biodisponibilidade dos minerais incluem 1) espécies de peixes, 2) ingestão dietética de nutrientes, 3) sua forma química, 4) digestibilidade da dieta, 5) tamanho de partícula, 6) interação com outros nutrientes, quelantes, inibidores, 7) estados fisiológicos e patológicos do animal, 8) água química, 9) tipo de processamento de alimentos, 10) quantidade do elemento e 11) presença de componentes inibitórios na dieta (HALLBERG 1981; FORBES; ERDMAN, 1983; HILTON, 1989; LALL, 2007).

Para avaliar a biodisponibilidade, o conhecimento sobre exigência, metabolismo e função é essencial. Alguns estudos também apontam que as fontes orgânicas de minerais têm taxas de absorção mais elevadas do que as fontes tradicionais, as inorgânicas (BELL, 1989; PARIPATANANONT; LOVELL, 1997; LE; FOTEDAR, 2014).

Minerais orgânicos ou quelatos são minerais associados a biomoléculas, como carboidratos e aminoácidos, que possuem estruturas mais estáveis e menor peso molecular, promovendo assim uma maior proteção ao micromineral, conferindo-lhe um caráter mais biodisponível. A quelação de minerais é um processo de produção baseado na atração entre as cargas positivas de certos cátions polivalentes e quaisquer de dois ou mais sítios de alta atividade eletronegativa, sendo empregada em alguns regimes de alimentação para aumentar a absorção em relação ao metabolismo mineral (ASHMEAD, 1992). Nutricionalmente, os quelatos com aminoácidos são usados para melhorar o fornecimento do elemento traço para o organismo. Existem muitos tipos de quelatos, tanto naturais como sintéticos, sendo sua função primordial a de evitar reações químicas do elemento com outras substâncias no trato digestivo, que formem compostos insolúveis e assim disponibilizar o cátion para outros sistemas que requerem tais

metais. Para que isso ocorra, as constantes de estabilidade das ligações quelantes devem ser compatíveis para a absorção intacta, mantendo a disponibilidade para a degradação nos locais de uso mais adequado para o mineral no corpo.

A vantagem de usar aminoácidos para quelar minerais essenciais é torná-los mais biologicamente disponíveis para o animal, oferecendo maiores possibilidades para regular a quantidade de um dado íon metálico a nível celular do que as técnicas utilizadas tradicionalmente. Isto limita suas interações com outros componentes da dieta, como inibidores ou outros microminerais, durante sua passagem pelo trato digestório, podendo assim apresentar maior disponibilidade se comparado às fontes inorgânicas de minerais (APINES-AMAR et al., 2004).

Os minerais quelatados são utilizados com sucesso em animais domésticos terrestres e em algumas espécies de peixes, apresentando maior biodisponibilidade do que as formas inorgânicas. Potencialmente, o uso de minerais quelatados com maior biodisponibilidade permite diminuir a suplementação, reduzindo custos de produção assim como o aporte pela excreção desses minerais, no ambiente aquático. Os quelatos de aminoácidos de zinco e cobre demonstraram estar mais disponíveis do que as fontes inorgânicas desses minerais para a truta arco íris (APINES-AMAR et al., 2004).

Para Wang e Lovell (1997), a inclusão de selênio nas dietas do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) pode ser reduzida quando o mineral é oferecido nas formas de selenometionina ou selênio associado a uma levedura. Os autores demonstraram que as biodisponibilidades das duas fontes orgânicas de selênio foram semelhantes para todas as variáveis medidas, exceto o crescimento. As biodisponibilidades relativas das fontes orgânicas variaram de uma média de 116% para a glutathione peroxidase (GSH-Px) no plasma e 465% no conteúdo de selênio muscular. Isso indica que o efeito positivo da quelação na biodisponibilidade do selênio vai além da absorção. Para o sistema imunológico de peixes teleósteos isso pode significar uma melhora na resposta imune quando desafiadas por patógenos bacterianos.

As formas quelatadas de cobre, ferro, manganês, selênio e zinco (proteínados) mostraram maior biodisponibilidade para o bagre do canal, em dietas semipurificadas e práticas (PARIPATANANONT; LOVELL, 1997). Os quelatos de aminoácidos de zinco e cobre parecem ser mais disponíveis do que as fontes inorgânicas desses minerais para truta arco íris (APINES et al., 2003). Formas orgânicas de selênio, incluindo selenometionina e Sel-Plex® (selênio associado à levedura)

demonstraram ter maior biodisponibilidade do que o selenito de sódio inorgânico para o bagre do canal (WANG et al., 1997). Outros estudos demonstraram que o aumento da biodisponibilidade de alguns minerais tem grande potencial para a melhora da resposta imune e a resistência às doenças em peixes (BELL, 1989; PARIPATANANONT; LOVELL, 1995; PARIPATANANONT; LOVELL, 1997; DO CARMO E SÁ et al., 2004; LE; FOTEDAR, 2014).

Microminerais presentes no BIOPLEX-Tr-Se-Peixe™

O produto Bioplex® é um composto de minerais ligados a aminoácidos e uma variedade de peptídeos com a função de otimizar o desempenho produtivo de peixes. Bioplex® de minerais traços (zinco, selênio, manganês, cobre e ferro) faz parte do programa de gestão de minerais da Alltech®, que oferece um gerenciamento moderno na nutrição mineral em peixes, alcançado através da inclusão de minerais em sua forma orgânica pela suplementação com Bioplex®.

Se³⁴ (Selênio)

O Se é amplamente distribuído em baixas concentrações em água doce e água do mar (NRC, 2011). É importante salientar que este mineral ocorre naturalmente em alimentos para animais, na forma de compostos de Se inorgânico, selenito e selenato, bem como em compostos orgânicos como selenometionina, selênio-metilselenometionina, selenocistina, selenocisteína e selenomettionina (WATANABE, 1997; LALL, 2000). Esses compostos de selênio também são capazes de proteger a toxicidade dos metais pesados, como o cádmio e o mercúrio (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997). Além disso, o conteúdo de Se nos ingredientes de origem vegetal varia de acordo com o nível e a disponibilidade biológica no solo, nas diversas localizações geográficas (SCOTT, 1973; LO; SANDI, 1980).

A farinha de peixe e subprodutos marinhos são fontes naturais de Se entre os alimentos comuns para peixes. No entanto, certas farinhas de peixe, por exemplo, de atum, podem ter uma baixa disponibilidade biológica, devido à formação de complexos de metais pesados e Se. Em contrapartida, a selenometionina é mais digestível quando comparada ao selênio presente na farinha de peixe (BELL, 1989).

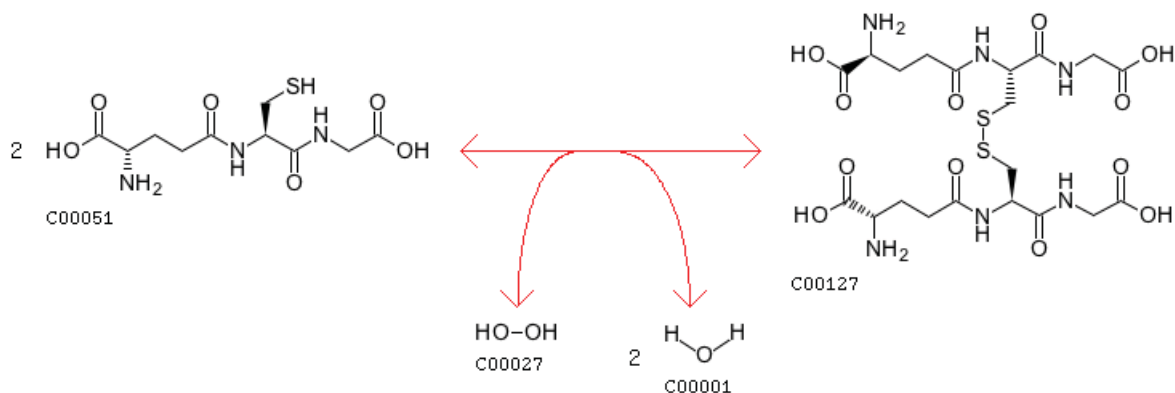
Esse micronutriente é considerado um oligoelemento essencial para o crescimento e metabolismo (FRACALOSSO; CYRINO, 2012), bem como para manter a saúde dos peixes sob condições de estresse.

Como componente essencial de proteínas contendo selenocisteína, está envolvido na maioria dos aspectos bioquímicos da função celular. Uma das primeiras descrições a respeito do seu envolvimento na resposta imune foi em 1959, por MacConnell (1959) que, após injetar Se em cães, foi observada a incorporação de isótopos desse mineral nos leucócitos.

O Se foi identificado por Rotruck (1973) como parte integrante da enzima glutathiona peroxidase (GPx; EC: 1.11.1.9). Este autor descreveu a atuação do Se na redução do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos e oxidação da glutathiona para dissulfeto de glutathiona (Figura 11) e, assim, a capacidade de mediar as concentrações de peróxido de hidrogênio, protegendo as membranas celulares contra danos causados pelos peróxidos. Dessa forma e sob tal complexidade, as selenoproteínas antioxidantes, como a GPx, são responsáveis por proteger neutrófilos de radicais derivados de oxigênio e são produzidas para matar o patógeno ingerido (LOVELL, 1998; LALL, 2002; LIN et al., 2005; NRC, 2011).

Figura 11. Reação glutathiona: peróxido-hidrogênio oxidoreductase.

Fonte: <http://www.genome.jp>



Em humanos, na forma de selenoproteínas, o Se desempenha um papel regulador essencial nos fagócitos, bem como sobre a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos. Desta forma, níveis insuficientes de selenoproteínas, que regulam as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estado redox dessas células, podem causar a morte induzida por oxidação de fagócitos e prejudicar a reposta imune (HOFFMANN, 2007).

Wang, Lovell e Klesius (1997), em estudo com o bagre do canal, afirmaram que o título aglutinante de anticorpos no soro para *Edwardsiella ictaluri* e a quimiotaxia de macrófagos em resposta a *Escherichia coli*, respondiam às concentrações dietéticas e às diferentes

fontes de Se. Em consequência disso, os autores concluíram que a forma como o Se foi incorporado também influenciou na resposta dos peixes.

O Se, junto com a vitamina E, é essencial para prevenir a distrofia muscular nutricional (LALL, 2002; NRC, 2011). Ambos agem como agente antioxidante em peixes, estando o Se diretamente ligado ao metabolismo dos compostos de α -tocoferol. Por conseguinte, uma ação sinérgica do Se com a vitamina E tem como função proteger fosfolipídios polinsaturados da membrana celular de danos peroxidativos (NRC, 2011). Wise e colaboradores (1993) avaliaram a produção de ânions de superóxido extracelular e intracelular em macrófagos renais do bagre do canal alimentados com dietas contendo vários níveis de Se (na forma de selenito de sódio) e vitamina E. Apesar da produção de ânions superóxido extracelulares não ter sido afetada pelos tratamentos, a produção de ânions superóxido intracelular foi maior para os peixes alimentados com quantidades quatro vezes maiores que a exigência de crescimento normal de Se e vitamina E.

Lin e Shiau (2007) analisaram o efeito da adição crescente do Se (selenometionina) e decrescente do cobre (sulfato de cobre) na dieta da garoupa de Malabar (*Epinephelus malabaricus*). Os resultados indicaram que a ingestão elevada de Cu induziu um estresse oxidativo na garoupa e diminuiu a resposta imune. Por outro lado, a suplementação dietética de Se, em duas vezes a adequada para crescimento, reduziu esse estresse oxidativo e melhorou a resposta imune do peixe, sugerindo que o Se atua na resposta imune como limitador ao estresse oxidativo. Portanto, esse mineral tem um grande potencial como mitigador dos efeitos imunossupressores dos agentes estressores, sempre presentes em condições de criação intensiva.

Há que se considerar, no entanto, que o Se também pode ser tóxico para os peixes em níveis acima do exigido para a espécie. Os níveis acima de 13 a 15 mg de Se kg^{-1} de ração podem ser tóxicos para truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) (HILTON et al., 1980). Outros estudos também relataram que o excesso de Se dietético resultou em crescimento reduzido, aumento da peroxidação lipídica, degeneração tecidual, maior mortalidade e diminuição da atividade da GSH-Px em peixes (POSTON et al., 1976; HILTON; HODSON, 1983; GATLIN; WILSON, 1984; WANG; LOVELL., 2007).

Fe²⁶ (Ferro)

O valor nutricional das fontes de ferro depende não apenas da sua concentração e proporção entre componentes orgânicos e

inorgânicos na dieta, mas também da quantidade absorvida e da biodisponibilidade para o animal. Fatores endógenos ao animal como tamanho, idade, fisiologia digestiva, estado nutricional e fatores exógenos como a influência de sua forma química nas interações com outros componentes dietéticos, também afetam diretamente a biodisponibilidade do Fe para os peixes (PARIPATANANONT; LOVELL, 1997; WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; LALL, 2000). Por exemplo, o ácido ascórbico aumenta a absorção de Fe (BARROS et al., 2002), enquanto que o fitato e o ácido tânico podem diminuir sua absorção (THORSTENSEN; ROMSLO, 1990). Alimentos de origem animal, como farinha de peixe, farinha de carne e sangue, são ricas fontes de Fe, mas as sementes de oleaginosas e os cereais também se destacam. O Fe de fontes animais pode ocorrer como porfirina, mioglobina e hemoglobina, enquanto que, nos cereais, pode estar em forma de fitina (LALL, 2000).

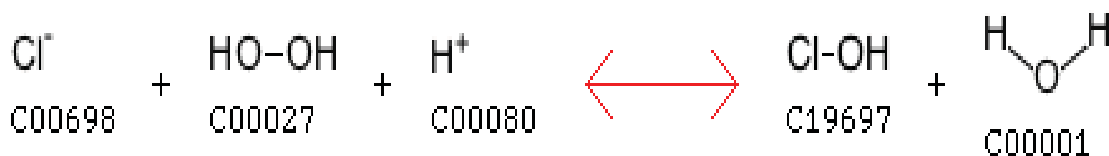
O Fe é um mineral traço de particular interesse devido a sua importância para a adequada função do sistema imunológico e, conseqüentemente, na defesa do hospedeiro contra a infecção (BEISEL, 1982; BHASKARAM, 1988). A manutenção de baixas concentrações de Fe livre nas mucosas, membranas e em outros tecidos é considerada uma das principais defesas inatas do hospedeiro contra infecções bacterianas (LALL, 2000).

Em sistemas biológicos, o Fe pode existir no estado ferroso (Fe^{2+}) ou férrico (Fe^{3+}), o que o torna essencial no transporte de oxigênio em compostos do pigmento respiratório (compostos heme), como a hemoglobina nos glóbulos vermelhos e a mioglobina no músculo, bem como as enzimas que contém o grupo heme, tais como peroxidase, catalase, citocromos, transferrina e ferritina (LIM; KLESIUS; SHOEMAKER, 2001). Em 1941, o médico sueco Kjell Agner, purificou a substância verde contida em pus, fleuma e leucócitos e encontrou uma proteína verde escura contendo Fe heme com atividade de peroxidase; essa enzima era a mieloperoxidase (MPO; EC 1.11.2.2) (KETTLE; WINTERBOURN, 2015).

A enzimologia complexa da MPO, seus oxidantes fugazes e papéis enigmáticos na biologia e patologia, atraem muita atenção da pesquisa atual. A MPO é uma peroxidase heme clássica que ativa o peróxido de hidrogênio para oxidar os substratos orgânicos aos radicais livres (KETTLE; WINTERBOURN, 2015). No entanto, o que diferencia a mieloperoxidase de outras enzimas é a capacidade excepcional do composto I de oxidar cloreto para cloro ou ácido

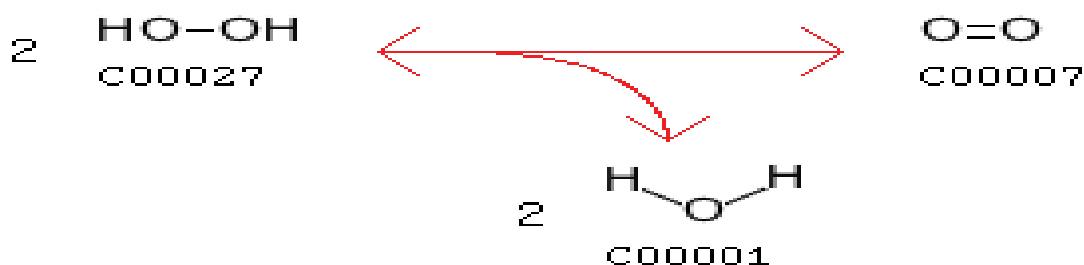
hipocloroso (Figura 12) - um composto forte que mata as bactérias e é tóxico para células humanas.

Figura 12. Reação oxidação do composto I da mieloperoxidase: peróxido de hidrogênio oxidoreductase (formação de hipocloreto). Fonte: <http://www.genome.jp>



Outra enzima dependente de ferro e importante para o controle do estresse oxidativo é a catalase (CAT; EC 1.11.1.6). Esta enzima é predominantemente encontrada no fígado de mamíferos e em eritrócitos do sangue, incluindo as células de algumas bactérias. Em um estudo realizado com diversas espécies de peixes, realizado por Rabie e colaboradores em 1972, demonstrou uma grande atividade desta enzima, sendo a tilápia-do-nilo a espécie que mais apresentou a atividade da catalase no sangue. Esta metaloenzima dependente de ferro é muito importante para a regulação de ERO, reduzindo o peróxido de hidrogênio nos organismos (figura 13). Em virtude de sua ação antioxidante ela funciona como um excelente biomarcador (GAD, 2011), e uma importante ferramenta na resposta imunológica de peixes.

Figura 13. Reação do Peróxido de hidrogênio: peróxido de hidrogênio oxidoreductase. Fonte: <http://www.genome.jp>



Em termos imunológicos, o Fe é um elemento com grande efeito na resistência às doenças. Essas premissas apontam que o metabolismo e a função do Fe nos peixes são semelhantes aos de outros vertebrados (LALL, 1989). Muito do estudado em relação ao Fe, foi

pelo fato de que existe um equilíbrio delicado entre a necessidade deste mineral nas defesas do hospedeiro e a exigência de microorganismos para seu crescimento. Os desequilíbrios comprometeriam o sistema imunológico e a resistência do peixe a doenças (LIM et al., 2001a).

Como o ferro livre é tóxico, a molécula de Fe é transportada juntamente com uma proteína, assim dois átomos de Fe⁺³ são ligados à uma molécula de transferrina, uma proteína beta-globulina. Se o nível de íons de Fe exceder a capacidade de ligação da transferrina, a toxemia de FE pode ocorrer (KIRON, 2012). Esse Fe excedente pode se ligar ao fósforo para formar um complexo insolúvel de Fe-fosfato que poderia levar também a uma deficiência de fósforo. Os principais efeitos da toxicidade do Fe incluem redução no crescimento, baixa taxa de conversão alimentar, inapetência, aumento da mortalidade, diarreia e dano histopatológico às células do fígado (LALL, 2000).

Zn³⁰ (Zinco)

Entre os ingredientes para formulação de dietas para animais, as principais fontes de Zn são a farinha de peixe, os concentrados proteicos vegetais e os grãos de cereais. A albumina de ovos, devido ao seu baixo teor de Zn (< 3 mg kg⁻¹), é geralmente utilizada em dietas experimentais de baixo teor de Zn.

Existem algumas diferenças na biodisponibilidade de Zn entre alimentos de origem vegetal e animal. Os fitatos solúveis, quando adicionados à proteína animal, diminuem a biodisponibilidade do Zn e representam grande parte da sua baixa disponibilidade na proteína das sementes oleaginosas (OBERLEAS, 1973). A biodisponibilidade de Zn na farinha de peixe é muito afetada pelo teor de fosfato de tri-cálcico (SATOH et al., 1987). Níveis mais elevados de Zn devem ser suplementados nas dietas práticas para compensar a reduzida biodisponibilidade de Zn causada pelo fitato, cálcio e fósforo dietéticos.

O Zn é um importante oligoelemento na nutrição dos peixes, pois regula muitos processos envolvidos em várias vias metabólicas, com papel de componente integral de uma série de metaloenzimas e como cofator específico de enzimas dependentes de Zn. Aproximadamente vinte Zn-metaloenzimas foram identificadas, incluindo anidrase carbônica, fosfatase alcalina, carboxipeptidase A e peptidases relacionadas, álcool desidrogenases e superóxido dismutase (SOD) (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; LALL, 2000).

A enzima superóxido dismutase citosólica (SOD₁) é dotada de centro metálico (cobre/zinco) no sítio catalítico (Cu/Zn-SOD; EC

1.15.1.1), assim como a SOD extracelular (SOD₃), da mesma forma que a SOD₁, possui um cobre/zinco no local catalítico. Esta enzima é encontrada em todas as células vivas que utilizam oxigênio molecular, convertendo o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (FRIDOVICH, 1974), como exemplificado na figura 14. Nos eritrócitos, o Zn está presente também na enzima SOD₁ (HAMBIDGE et al., 1986). Por sua ação antioxidante, o Zn é necessário para a manutenção da integridade da membrana dos eritrócitos, protegendo os sulfidrilos dos grupos lipomembrana da ação dos radicais livres, principalmente o superóxido (O'DELL et al., 1987).

Figura 14. Reação superóxido: superoóxido oxidoreductase. Fonte: <http://www.genome.jp>



A extensa distribuição do Zn no meio ambiente e nas dietas para animais leva a crer que uma deficiência de Zn seria improvável. Entre 1973 e 1974, uma ocorrência generalizada de cataratas em truta-arco-íris alimentadas com dietas práticas nos Estados Unidos, levou à constatação de que Zn não estava disponível na farinha de peixe branco usada na fabricação da ração (KETOLA, 1979). Por outro lado, Zn em excesso na dieta pode afetar negativamente outros elementos, como ferro, cádmio e magnésio (CLEARWATER; FARAG; MEYER, 2002), causando redução no crescimento (JENG; SUN, 1981).

Cu²⁹ (Cobre)

O cobre é amplamente distribuído em alimentos e no ambiente aquático, portanto, sua deficiência ocorreria em peixes somente em condições extremas. Já os ingredientes de alimentos processados, de origem vegetal e animal, podem mostrar um conteúdo variável de Cu, resultante principalmente de contaminantes metálicos. Outro detalhe importante relativo ao estado nutricional do cobre é que durante o processamento de materiais ricos em proteínas, a umidade proporciona uma condição favorável para a absorção de Cu pela fração protéica (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; LALL, 2000). A maioria dos

ingredientes de proteína animal e vegetal contém entre 5 a 30 mg de Cu/kg.

O cobre funciona como componente estrutural em inúmeras enzimas. Essas metaloenzimas de Cu estão envolvidas na produção de energia celular (citocromo oxidase), proteção de células contra danos oxidativos (SOD₁), neurotransmissores cerebrais (dopamina hidroxilase e monoxigenase amidatária de peptidil), síntese de colágeno (lisil oxidase) e produção de melanina (tirosinase). O cobre também é ligado à proteína ceruloplasmina, que ocorre na célula sanguínea e no plasma e está envolvida na utilização do ferro pelo organismo. A ceruloplasmina transporta Cu, além de ajudar a converter o ferro em uma forma que pode ser transportada para outros tecidos (O'DELL, 1976; WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; LALL, 2000). Uma das poucas investigações sobre o metabolismo do cobre nos peixes, por Syed e Coombs (1982), revelou semelhanças com os mamíferos na distribuição de cobre e enzimas dependentes desse elemento.

A toxicidade oral deste elemento, resultante de poluentes em água natural ou produzida experimentalmente, produzem efeitos que incluem danos às brânquias, necrose no fígado e rim, redução do crescimento, baixa eficiência alimentar e elevação dos níveis de Cu do fígado (MURAI et al., 1981; LANNO et al., 1985; GATLIN; WILSON, 1986b; WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; LALL, 2000).

Mn²⁵ (Manganês)

Os ingredientes utilizados nas rações de peixes apresentam concentrações variadas deste mineral. Peixes alimentados com dietas práticas contendo farinha de peixe branco, farinha de peixe integral, farinha de arenque (*Clupea harengus*), farinha de capelim (*Mallotus villosus*) e farinha de sardinha (*Sardinops sagax*), sem Mn suplementar, apresentaram piora no crescimento quando comparados com peixes alimentados com a mesma dieta, porém, com suplementação de Mn (SATOH et al., 1989; LALL, 2000). Entre as fontes vegetais, o farelo de arroz, farelo de trigo, farinha de alfafa, grãos de milho seco de destilaria com solúveis (DDGS) e cereais são boas fontes de Mn (WATANABE, 1997).

Os níveis de cálcio e fósforo podem ser fatores limitantes na disponibilidade do Mn para os peixes. Dietas contendo fosfato tricálcico promoveram uma redução nos níveis de Mn retidos pelos peixes (SATOH, TAKEUCHI e WATANABE 1991). Nos peixes que não apresentam estômago, como é o caso da carpa, essa interação pode não

existir, devido à redução da capacidade de solubilizar o fosfato tricálcico (SATOH, POE e WILSON, 1989).

A disponibilidade do Mn difere entre os vários sais inorgânicos. As fontes de sais inorgânicos utilizadas para a inclusão de Mn nas dietas são o óxido manganoso, carbonato manganoso, sulfato manganoso e o cloreto manganoso (SATOH et al., 1987; LALL, 1989) e, dependendo da espécie, essas fontes apresentam baixa biodisponibilidade, com redução nos índices zootécnicos.

O manganês é um elemento importante para o crescimento normal, reprodução e prevenção de anormalidades esqueléticas em peixes e é amplamente distribuído no tecido animal. Este mineral tem funções importantes como ativador de metaloenzimas específicas (glicosiltransferases) e não específicas (quiases, transferases, hidrolases e descarboxilases), importantes no metabolismo de proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; LALL, 2002). O Mn está envolvido na formação óssea, na coagulação sanguínea, na função da insulina e na síntese do colesterol (WEBSTER; LIM, 2015). Está envolvido em sistemas bioquímicos como um ativador enzimático e como metaloenzima da Mn superóxido dismutase mitocondrial (SOD2) atuante na primeira linha contra danos oxidativos (DE ROSA et al., 1980).

JUSTIFICATIVA

Devido à importância socioeconômica da tilápia para a aquicultura, é fundamental, portanto, a pesquisa para encontrar alternativas eficientes para toda cadeia produtiva. Apesar dos progressos a respeito dos estudos nutricionais dos minerais inorgânicos, ainda existem muitas lacunas no conhecimento das exigências quantitativas e suas funções fisiológicas na maioria dos peixes, principalmente no que diz respeito à forma orgânica dos minerais dietéticos.

O uso de minerais orgânicos (quelatos) na alimentação de peixes apresenta um potencial elevado para a sustentabilidade da piscicultura, pois nesta forma, os minerais têm maior biodisponibilidade e taxa de absorção. Com o melhor aproveitamento desses elementos pelos peixes pode conseqüentemente auxiliar na melhora de toda fisiologia animal, incluindo suas respostas imunológicas.

Várias condições patológicas e sinais de deficiência nutricional de etiologia desconhecida são observados nas operações aquícolas. Muito disso pode ocorrer devido a um desequilíbrio mineral dietético

e/ou uma absorção limitada ou excessiva desses elementos da água. Definir o papel dos minerais orgânicos na resposta imune e prevenção de doenças é uma área de pesquisa promissora e interessante. Nos últimos anos, a vitamina E e o selênio foram implicados na prevalência de várias doenças infecciosas.

Bacterioses são hoje uma das maiores preocupações para indústria aquícola, devido a importantes perdas com mortalidade causadas por esse grupo, sendo a bactéria Gram positiva *Streptococcus agalactiae* uma das mais frequentes no desenvolvimento de enfermidades na tilapicultura. Um manejo nutricional inadequado pode potencializar a ação dos patógenos no aparecimento de surtos no cultivo.

Considerando o potencial nutricional do uso de minerais orgânicos na alimentação de peixes tanto no desempenho zootécnico como na resistência a patógenos, torna-se necessário um maior entendimento sobre o melhor aproveitamento desses nutrientes para a tilápia-do-nilo, o que pode representar uma melhora na resposta imunológica e resistência a enfermidades nas operações aquícolas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os parâmetros hemato-imunológicos, estado antioxidante e resistência à infecção pela bactéria *Streptococcus agalactiae* em juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), quando alimentados com diferentes concentrações de microminerais (zinco, ferro manganês, cobre e selênio) na forma orgânica ou inorgânica.

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar parâmetros hematológicos: contagem total de eritrócitos, percentual de hematócrito, concentração de hemoglobina total, índices hematimétrico, trombócitos, leucócitos e contagem do diferencial de leucócitos.
- ✓ Avaliar parâmetros imunológicos: atividade aglutinante do soro, proteínas e imunoglobulinas total no soro, atividade antimicrobiana do sangue e atividade bactericida da mieloperoxidase.
- ✓ Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, glutatona peroxidase, catalase.

- ✓ Avaliar os danos oxidativos, através da quantificação de carbonilas proteicas e a deteriorização de ácidos nucleicos pela eletroforese em gel.
- ✓ Avaliar danos hepáticos por meio da determinação da atividade das enzimas alanina transaminase e aspartato transaminase.

ARTIGO CIENTÍFICO**RESISTÊNCIA À INFECÇÃO CAUSADA POR *Streptococcus agalactiae* PELA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*), QUANDO ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE MINERAIS ORGÂNICOS**

Allan David SILVA, Bruno Pierri SILVA, Gabriel Fernandes Alves JESUS, Alcir Luiz DAFRÉ, José Luiz Pedreira MOURIÑO, Débora Machado FRACALOSSO

*Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga
1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.*

RESUMO

O adequado suprimento de minerais na dieta é essencial para o desenvolvimento do sistema imunológico dos peixes, deixando-os mais aptos para enfrentar enfermidades em sistemas intensivos de criação. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a resistência de juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) à infecção com *Streptococcus agalactiae*, quando alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, na forma do aditivo BIOPLEX-TR-Se-Peixe™, produzido pela empresa Alltech. Além da sobrevivência, foram avaliados o status antioxidante, alterações hematológicas e respostas imunes celulares e humorais não específicas. Trinta e seis grupos de 22 peixes foram alimentados por 56 dias com níveis crescentes (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) do aditivo, contendo os minerais Fe, Cu, Zn, Se e Mn, além de uma dieta suplementada com 100% destes minerais na forma inorgânica. Após o ensaio alimentar, dezoito grupos de dezenove peixes foram inoculados com 5×10^7 unidades formadoras de colônia mL⁻¹ na cavidade intraperitoneal, dose esta previamente estabelecida como suficiente para infectar 50% dos peixes alimentados com ração comercial (DL₅₀). A mortalidade foi avaliada diariamente, a cada 4 h, até 120 h após o desafio. Amostras de sangue e soro foram coletadas antes e 120 h após o desafio, para realização das análises hemato-imunológicas. Já para avaliação do status antioxidante, amostras de sangue e fígado foram coletadas somente 48 h após o desafio. Em geral, as diferentes suplementações minerais testadas não afetaram de forma clara as respostas hemato-imunológicas. Entretanto, a dieta contendo 50% de suplementação na forma orgânica e a dieta contendo 100% da suplementação na forma inorgânica, propiciaram melhora no status antioxidante dos peixes, sendo que a primeira dieta permitiu também maior sobrevivência após o desafio bacteriano. Estas suplementações, por quilograma de ração, foram equivalentes a 18 mg Cu, 223 mg Fe, 53 mg Zn, 21 mg Mn e 0,34 mg Se na dieta com 50% de suplementação na forma orgânica, bem como a 33 mg Cu, 198 mg Fe, 55 mg Zn, 34 mg Mn e 0,70 mg Se na dieta com 100% da suplementação na forma inorgânica.

Palavras-chave: Tilápia-do-nilo; Infecção bacteriológica; Sangue; Estresse oxidativo; Minerais orgânicos.

1. INTRODUÇÃO

Bacterioses são uma das maiores preocupações para indústria aquícola. As bactérias do gênero *Streptococcus* em função da sua ocorrência expressiva em criatórios de peixes são foco de estudos relacionados às causas de enfermidades. *Streptococcus agalactiae* é uma das mais frequentes no desenvolvimento de enfermidades na aquicultura [1]. Dentre os diversos agentes estressores que podem desencadear surto de algumas doenças a redução ou a privação de nutrientes na dieta pode ser o mais preponderante [2].

Tradicionalmente, a suplementação de minerais traços na dieta é realizada através da inclusão de sais inorgânicos, como carbonatos e sulfatos, porém, estas fontes possuem baixa biodisponibilidade [3]. Alguns estudos apontam que as fontes orgânicas de minerais têm taxas de absorção mais elevadas do que as fontes tradicionais, as inorgânicas [4-6].

No entanto, estudos também demonstraram que o aumento da biodisponibilidade de alguns nutrientes melhora a resposta imune e a resistência a doenças em peixes. Estudos [4,7,8] testaram diferentes formas de suplementação de minerais dietéticos (orgânicos e inorgânicos) sobre o crescimento e saúde de diferentes espécies de peixe. Microminerais orgânicos, ou quelatos, são minerais associados com biomoléculas, como carboidratos e aminoácidos, que possuem estruturas mais estáveis e menor peso molecular, promovendo assim uma maior proteção ao micromineral. Isto limita suas interações com outros componentes da dieta, como inibidores ou outros microminerais, durante sua passagem pelo trato digestório, podendo assim apresentar maior disponibilidade se comparado às fontes inorgânicas de minerais [3]. Para o sistema imunológico de peixes teleósteos, isso pode significar uma melhora na resposta imune quando confrontados por patógenos bacterianos.

Os peixes detêm um sistema de defesa armado com um complexo e extenso número de agentes com a função de prevenir a infecção inicial assim como a multiplicação dos agentes patogênicos após a infecção iniciada. Os peixes possuem tanto um sistema de defesa imune inato (não específico) quanto um adaptativo (específico), sendo que os parâmetros inatos estão na vanguarda da defesa imunológica, podendo ser um fator crucial na resistência às enfermidades.

O uso de parâmetros hematológicos como indicadores da saúde de peixes foi proposto por Hesser [9]. Desde então, muitos estudos

avaliam a composição físico-química do sangue, uma vez que reflete o estado fisiológico do indivíduo em um determinado momento. Nesse panorama, a hematologia clínica permite a avaliação das condições de defesa orgânica e permite ao pesquisador identificar as respostas dos peixes frente aos desafios de criação de forma eficaz [10,11]. De acordo com estudos realizados por Clauss e colaboradores [12], doenças em peixes causam anomalias em eritrócitos e conseqüentemente anemias, sendo *Streptococcus spp.* a causa mais comum de anemia hemolítica em peixes.

O sistema imunológico do peixe também é rigidamente regulado pelo estresse oxidativo [13,14], que é parcialmente responsável pela maior incidência de doenças e grave taxa de mortalidade [15]. Para avaliar o status antioxidativo do animal e comum a quantificação da atividade de enzimas antioxidantes, assim como dos marcadores de estresse oxidativo como os danos ao DNA e RNA e quantificação de carbonilas proteicas. O stress oxidativo ocorre quando o organismo tem níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ERO). A própria resposta imune produz incontáveis compostos oxidativos, a fim de destruir os agentes de invasão. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), além de participarem da proteção do organismo contra ERO são enzimas dependentes de minerais como cofatores para suas atividades.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência à infecção ocasionada por *Streptococcus agalactiae*, pela tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com diferentes níveis de minerais orgânicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e aclimação

Juvenis saudáveis, de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), adquiridos no mercado piscicultor de Santa Catarina, permaneceram em quarentena em água salinizada (2 ppt) e foram aclimatados em unidades experimentais circulares de 1000 L, pelo período de vinte e cinco dias anterior ao início do ensaio alimentar. Durante a aclimação, os peixes foram alimentados com ração comercial (9:00 h – 16:00 h) até a saciedade aparente. Todo o manejo realizado com os peixes neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UFSC.

2.2. Bactéria e determinação da DL₅₀

A cepa patogênica *S. agalactiae* (AQP/049), utilizada no desafio experimental, foi isolada de tilápias acometidas por estreptococose em um surto de mortalidade no estado do Ceará, Brasil, disponibilizada pelo Núcleo de patologia aquícola – NEPAQ/UFSC. A bactéria foi semeada em tubos contendo meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) (HiMedia, Mumbai, Índia), semeadas em placas de Petri contendo meio sólido BHI (HiMedia) e incubadas a 28 °C por 24 h. Para a determinação da concentração da dose letal 50% (DL₅₀) a suspensão bacteriana, após submetida a três diluições, foi usada para desafiar grupos de 4 peixes (115,07 ± 2,02 g) em duplicata e a taxa de mortalidade foi analisada usando o software Spear-man-Karber [16]. A dose determinada na DL₅₀ para ser utilizada no desafio experimental foi de 5 x 10⁷ UFC/mL.

2.3. Dietas experimentais

Dietas foram elaboradas com diferentes níveis de inclusão de BioPlex-TR-Se PEIXE™ (Ferro, Zinco, Manganês, Cobre e Selênio) em substituição ao premix de microminerais de fonte inorgânica. Os tratamentos 25%, 50%, 75% e 100% consistiram em dietas contendo a inclusão mineral na sua forma orgânica BioPlex-TR-Se Peixe™, além de uma dieta controle com 100% de suplementação mineral inorgânica e uma dieta sem suplementação mineral orgânica (0%), totalizando seis tratamentos. O tratamento sem suplementação (0%) contém os minerais (Ferro, Zinco, Manganês, Cobre e Selênio) encontrados na dieta basal, atendendo às exigências nutricionais mínimas da tilápia-do-nilo. A dieta 100% inorgânica contém o nível de microminerais comumente adotado na indústria, todos maiores que a exigência nutricional da espécie [17].

A dieta basal (Tabela 1) foi elaborada a fim de atender todas as exigências nutricionais estabelecidas para a espécie [17,18], exceto para os microminerais testados. A composição centesimal [19] das dietas utilizadas no experimento, bem como a concentração, foi determinada por espectrometria de massa com fonte de plasma (ICP-MS), sendo os microminerais avaliados (Fe, Zn, Cu, Mn e Se) apresentados na Tabela 2.

Durante o ensaio alimentar, realizado no Laboratório de Cultivo de Peixes de Água Doce – LAPAD, os parâmetros físico-químicos da água permaneceram dentro dos limites de conforto para a espécie.

Tabela 1. Formulação da dieta basal utilizada no período de alimentação.

Ingredientes	Quantidade, %
Arroz quebrado	50,35
Caseína	28,00
Gelatina	10,00
Premix macromineral	2,70
Óleo de soja	2,57
Óleo de fígado de bacalhau	2,39
Fosfato de cálcio	1,99
Celulose ¹	1,00
Premix deficient nos microminerais alvo ¹	1,00

²Premix sem os microminerais presentes no BIOPLEX-Tr-Se-PeixeTM.

Tabela 2. Composição das dietas (em matéria seca).

Nutriente	BIOPLEX-Tr-Se-Peixe[®], %					100% Inorgânico
	0	25	50	75	100	
Umidade, %	12,72	12,91	11,49	11,92	11,71	11,60
Proteína bruta, %	36,90	36,66	35,80	36,40	36,70	37,30
Lipídio, %	4,88	4,81	5,00	4,68	4,85	4,76
Materia Mineral, %	3,00	2,88	2,94	2,96	2,92	3,03
Cu, mg.kg ⁻¹	0,81	10,0	18,0	27,0	36,0	33
Fe, mg.kg ⁻¹	87	148	223	274	346	198
Zn, mg.kg ⁻¹	13,0	33	53	73	94	55
Mn, mg.kg ⁻¹	5,0	13,5	21,0	29,5	38,0	34
Se, mg.kg ⁻¹	0,20	0.3	0.34	0.4	0.44	0,70

2.4. Delineamento do desafio bacteriológico

Após os cinquenta e seis dias de alimentação com as dietas experimentais, trezentos e quarenta e dois peixes (peso inicial, 23,93 ± 0.80 g; peso final, 147,27 ± 3,02 g) foram transportados para o Núcleo de Patologia Aquícola – NEPAQ, para a realização do desafio experimental. Grupos de 19 peixes foram aclimatados em 18 unidades experimentais de 100 L, de acordo com os níveis de suplementação usados, em triplicata.

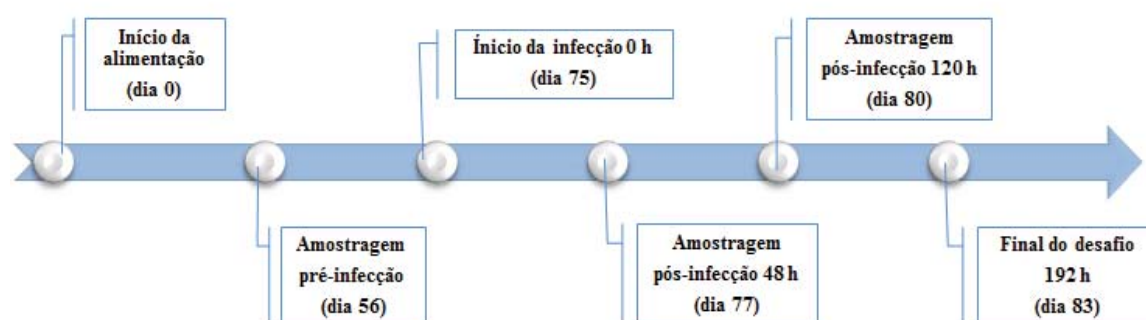
A cepa de *S. agalactiae* foi cultivada em meio de cultura BHI (Himedia, India) à 28 °C durante 24 h. A cultura foi centrifugada a 1500 x g, durante 10 min, sendo o sobrenadante descartado. A bactéria precipitada foi ressuspensa em solução de PBS (0,04 M fosfato de

sódio monobásico e 0,16M fosfato de sódio dibásico, em pH 7,2) na concentração de 5×10^7 UFC mL⁻¹ (dose definida no ensaio de DL₅₀).

Após 96 h de aclimatação, os animais foram inoculados na cavidade intraperitoneal com a solução contendo *S. agalactiae* na proporção de 100 µL/peixe. Um grupo controle (19 peixes em uma unidade experimental) foi inoculado com a mesma proporção, porém somente com solução PBS, sem a presença da bactéria.

A mortalidade e a presença de sinais clínicos foram avaliadas diariamente, a cada 4 h, até o final do desafio experimental (192 h). Os peixes mortos foram coletados imediatamente para realização do Postulado de Koch, isolamento da bactéria e confirmação da infecção. Coletaram-se de forma asséptica fragmentos de rins, baço e cérebro, sendo o conteúdo plaqueado em meio ágar triptona de soja (TSA, HiMedia), enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado; as placas foram incubadas a 28 °C por 24 h para visualização e caracterização das colônias de *S. agalactiae*.

Figura 1. Desenho esquemático do delineamento utilizado no presente estudo.



2.5. Amostragem

Para as amostragens, os peixes foram anestesiados com Eugenol[®] (75 mg.L⁻¹), o sangue coletado por punção da veia caudal com seringas de 3 ml contendo heparina (concentração). As amostras dos fígados foram congelados (-80 °C) para posteriores análises. Após analgesia, amostras de sangue foram coletadas antes da infecção (três peixes por unidade experimental) ao final dos 56 dias de alimentação e após 120 h da infecção (três peixes por unidade experimental), para análise dos parâmetros hemato-imunológicos. Para os parâmetros antioxidativos e atividade da mieloperoxidase plasmática foram

coletados o sangue e o fígado, após 48 h da infecção (três peixes por unidade experimental e nove peixes do controle PBS) (Figura 15).

2.6. Parâmetros hemato-imunológicos

2.6.1. Imunidade celular não específica

A concentração de glicose plasmática foi determinada de forma individual, imediatamente após a coleta de sangue, com glicosímetro portátil Accu-Chek® Advantage (Roche Diagnóstica, Brasil). Uma alíquota de sangue foi utilizada para a confecção de extensões sanguíneas em duplicata e coradas com MayGrunwaDL/Giemsa/Wright - MGGW de acordo com Ranzani-Paiva e colaboradores [10] para a contagem total leucócitos, contagem diferencial de leucócitos e trombócitos pelo método indireto, segundo Ishikawa e colaboradores [20]. Uma alíquota foi utilizada para os parâmetros analíticos das células vermelhas de acordo com Wintrobe [21]. Foram analisados o hematócrito, determinado manualmente pela centrifugação do sangue heparinizado em capilares de vidro a 13.000 g por 10 min [22]. Posteriormente, os capilares foram quebrados e a fração plasmática foi utilizada para determinação da proteína plasmática total em refratômetro portátil (modelo 301, Biobrix, São Paulo, Brasil). A concentração total de eritrócitos por unidade de volume (RBC), foi realizado pelo método do hemocítmetro em câmara de Neubauer, utilizando uma alíquota de sangue (5 µl) diluído em fluido de Dacie modificado de acordo com Blaxhall e Daisley [23], na proporção 1:200. A concentração de hemoglobina foi analisado pelo resultado obtidos pelo kit comercial Labtest® utilizando o método de cianeto de hemiglobina (HiCN), e medido em espectrofotômetro a 540 nm. Os índices hematológicos como volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina média (CHCM) foram calculados pelas seguintes equações, de acordo com Ranzani-Paiva e colaboradores [10]:

$$\text{VCM} = \text{Ht (L/L)} \times 10 / \text{n}^\circ \text{eritrócitos (10}^6 \text{ }\mu\text{L}^{-1})$$

$$\text{HCM} = \text{hemoglobin (g L}^{-1}) / \text{n}^\circ \text{eritrócitos (10}^6 \text{ }\mu\text{L}^{-1})$$

$$\text{MCHC} = \text{hemoglobin (g dL}^{-1}) / \text{Ht (L L}^{-1})$$

2.6.1.1. *Atividade da mieloperoxidase*

A quantificação da atividade enzimática foi feita utilizando o *Myeloperoxidase Activity Assay Kit*, adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante fornecido juntamente com o kit. A absorbância foi lida no leitor de placas ELISA (Biotek India Pvt. Ltd.).

2.6.2. *Imunidade humoral não específica*

Para as análises imunológicas, o sangue foi coletado, sem adição de anticoagulante, para a confecção de um “*pool*” de três peixes por unidade experimental, o qual resultou da mesma quantidade de soro de cada peixe. O sangue, após coagulado, foi centrifugado a 1.400 x g durante 10 min para retirada do soro e armazenamento a -20°C.

2.6.2.1. *Proteína sérica total*

A concentração de proteína sérica total foi medida pelo método de biureto descrito por Weichselbaum [24] pelo kit “Proteínas Totais” (Labtest[®], Minas Gerais, Brasil).

2.6.2.2. *Imunoglobulinas*

A concentração de imunoglobulina total foi mensurada de acordo com o método descrito por Amar e colaboradores [25], onde foram misturados 50 µL do soro com 50 µL de solução de polietilenoglicol (PEG) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a 12%, sendo a mistura incubada a 25 °C por 2 h, a fim de precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi separado por centrifugação (5.000 x g a 4 °C por 10 min) e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a concentração de proteína total, pelo método de biureto. A concentração de imunoglobulina total foi expressa em mg.mL⁻¹, sendo calculada pela seguinte equação:

$$\text{Ig Total (mg/mL)} = \text{proteína total do soro} - \text{proteína tratada com PEG}$$

2.6.2.3. *Atividade aglutinante do soro*

O título da atividade aglutinante do soro foi realizado de acordo com Yildirim e colaboradores [26]. A bactéria *S. agalactiae* foi cultivada e inativada em formalina tamponada 10%, sendo o teste realizado em microplacas de 96 poços de fundo em “U”, diluído na proporção de 1:1 em solução tampão fosfato-salino PBS (ph 7,4). No primeiro poço foram utilizados 50mL de PBS: 50 mL de soro, e para os demais poços foi realizada a diluição seriada até o 12º poço. Após esse procedimento, 50 µL da bactéria inativada (*S. agalactiae*) foi adicionada em todos os poços na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹. A microplaca foi incubada a 25 °C por 18 h em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada visualmente observando-se o fundo do poço. O título de aglutinação será considerado recíproco ao último poço que apresentou aglutinação.

2.6.2.4. *Atividade antimicrobiana do soro*

A atividade antimicrobiana do soro foi realizada contra a bactéria: *S. agalactiae*, em microplaca de 96 poços com fundo chato, de acordo com Silva et al., [27]. O inóculo da *S. agalactiae* foi crescido em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) a 28 °C por 24 h na concentração de 0,5 na escala de Macfarland e diluído em meio de cultura pobre (PB, do inglês *Poor Broth*) 100.000 vezes. Posteriormente, foi realizada diluição seriada do soro em meio PB no fator 1:2 até o 12º poço. Finalmente, 20 µL da bactéria foi adicionado em cada poço da amostra diluída do soro e do controle positivo. Para o controle negativo, foi adicionado 20 µL de meio PB. A microplaca contendo contendo *S. agalactiae* foi incubada a 28 °C por 24 h. O crescimento do microorganismo foi determinado em leitora de microplaca (Expert Plus Asys®) a 550 nm. A atividade antimicrobiana do soro foi recíproca à última diluição que apresentou atividade bactericida.

2.7. *Parâmetros antioxidantes*

Foram avaliadas as atividades de diferentes enzimas do fígado dos peixes após 48 h do desafio experimental.

2.7.1. *Atividade da superóxido dismutase (SOD)*

O tecido hepático foi homogeneizado em tampão Hepes (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico) 20 mM, pH 7,4, utilizando um homogeneizador de tecidos (Omni TH, NW Kennesaw, GA) em 1:10 peso : vol. Os restos celulares foram sedimentados a 3.000 x g durante 15 min. O sobrenadante foi posteriormente centrifugado a 20.000 x g durante 20 min. O sedimento foi ressuspensão e tomado como fração enriquecida em mitocôndria e peroxissomos. O sobrenadante foi usado como a fração citosólica.

Uma reação química de EDTA, manganês, 2-mercaptoetanol e oxigênio molecular gera superóxido. A geração química de superóxido e pH fisiológico (7,4) pode ser considerada como positiva para esse método [28]. A oxidação do NADH pelo superóxido leva a uma diminuição contínua da absorvância a 340 nm, que é seguida por 30 minutos em um leitor de placas (leitor de placas Tecan Infinity 200). A atividade da SOD inibe a oxidação de NADH dirigida por superóxido. Para determinar a inibição de 50%, é feita uma curva com diferentes diluições da amostra até a completa inibição da oxidação de NADH. Nenhuma amostra é adicionada em um poço para obter a taxa de reação de 100%. Uma unidade de SOD é a quantidade de amostra que produz uma inibição de cinquenta por cento da reação.

2.7.2. *Atividade da catalase (CAT)*

A baixa afinidade e altas taxas de *turnover* permitem a medição da atividade da catalase após o desaparecimento do substrato (H_2O_2) [29]. A uma concentração (10 mM em fosfato de potássio 50 mM / EDTA 0,5 mM) o desaparecimento de H_2O_2 é proporcional à atividade de catalase, que pode ser seguida a 240 nm num leitor de placas.

2.7.3. *Atividade glutatona peroxidase (GPx)*

A atividade de GPx foi ensaiada com o substrato hidroperóxido de cumeno (1 mM) e GSH (1 mM), na presença de glutatona redutase ($0,2 \text{ U mL}^{-1}$) e 0,2 mM de NADPH. A glutatona é o doador de elétrons que permite à GPx reduzir os peróxidos, formando o GSSG no processo. O excesso de glutatona redutase de fonte comercial adicionado à mídia, torna a redução de GSSG proporcional à atividade de GPx. A redução de GSSG é seguida pelo consumo de NADPH, que pode ser monitorado a 340 nm [30].

2.7.4. *Níveis de glutathiona (GSH)*

As amostras de fígado foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,5 M arrefecido (1:10). Os homogenatos foram centrifugados a 15.000 × g por 5 min, em centrífuga refrigerada (4 ° C). O sobrenadante foi isolado e neutralizado em tampão fosfato (0,5 M, pH 7,4) para posterior dosagem de GSH-t.

Para amostras de sangue, foi utilizado ácido tricloroacético 0,5 M no lugar de ácido perclórico, uma vez que a utilização deste ácido evita o consumo de GSH após a precipitação da hemoglobina [31].

Para glutathiona total (GSH-t), utilizou-se o ensaio de reciclagem enzimática da glutathiona redutase/ácido ditionitrobenzóico, que detecta formas de glutathiona igualmente reduzidas (GSH) e oxidadas (GSSG). Este método baseia-se na formação contínua de tionitrobenzoato no meio de incubação [32]. Os valores de GSH-t são obtidos utilizando uma curva padrão com concentrações conhecidas de GSH e expressas em equivalentes de GSH.

2.8. *Marcadores de estresse oxidativo*

2.8.1. *Ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE)*

A eletroforese de célula única (ensaio de cometa) foi realizado de acordo com Singh e colaboradores [35], com pequenas modificações. O dano ao DNA foi acessado nos glóbulos vermelhos da tilápia-do-nylo. Após a coleta em seringas heparinizadas, uma alíquota de sangue foi diluída em 160 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,75% em tampão PBS a 37 ° C) e distribuída, em duplicata, em lâminas de vidro pré-revestidas com agarose. Pelo menos 100 células de cada amostra (50 por lâmina replicada técnica) foram classificadas visualmente em cinco classes (0, 1, 2, 3 e 4) de acordo com o tamanho/intensidade da cauda. A classe zero corresponde ao DNA não danificado e classe 4 às células com dano máximo ao DNA [35]. Danos no DNA foram expressos como índice de dano ao DNA para cada grupo. O índice de dano é calculado como o número de células encontrado para cada classe de dano (0-4) multiplicado pelo respectivo número de classe (0-4), o que dá um valor que varia de 0 a 400.

2.8.2. *Ensaio para determinação dos adutos de carbonilas*

A carbonila proteica foi realizada por *Dot blot*. As amostras foram homogeneizadas em Hepes a 20 mM pH 7,0 e derivadas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH, Sigma D199303) como descrito anteriormente [36]. Resumidamente, as proteínas foram desnaturadas com SDS a 6% e derivadas com DNPH a 20 mM em HCl a 2 N, durante uma hora, a temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram neutralizadas com Tris 2 M/Glicerol a 30%, seguido da adição de 5% de p-mercaptoetanol. Adicionou-se uma alíquota de 2 µl (0,2 µg de proteína) a uma membrana de PVDF ativada. O excesso de DNPH foi removido por lavagens sucessivas com ácido acético. As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado e incubadas com anticorpo primário específico anti-DNP (1: 10000, Abcam, Cambridge, EUA) por 24 horas a 4°C.

As membranas foram expostas a anticorpos secundários conjugados com peroxidase apropriados e visualizadas utilizando-se um kit com substrato quimioluminescente ECL para detecção de proteínas (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). As imagens foram obtidas em um aparelho ChemiDoc (BioRad Lab, La Jolla, EUA). A análise densitométrica foi realizada utilizando o software Image J como controle de carga de proteínas foi realizado a coragem da membranas com Ponceau S. A relação de DNP/Ponceau S. foi utilizada para a determinação dos adutos de carbonila.

2.9. *Marcadores de danos hepáticos*

2.9.1. *Atividade a alanina aminotransferase (ALT) e aspartado aminotrasferase (AST)*

As atividades enzimáticas de ALT e AST foram determinadas utilizando o kit comercial MAK052 e MAK055, adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante fornecido juntamente com o kit. A absorbância foi lida no leitor de placas ELISA (Biotek India Pvt. Ltd.).

2.10. *Análise dos dados*

Os dados resultantes dos tratamentos 0%, 25%, 50%, 75% e 100% orgânico - para a análise das variáveis hemato-imunológicas - foram submetidos à análise de regressão com nível de significância de 5%.

Nas comparações entre os dados resultantes dos tratamentos 0% e 100% orgânico e 100% inorgânico, foi realizado o teste de Levene para verificação de homocedasticidade, em seguida o teste de Shapiro-Wilks, para verificar a normalidade. Posteriormente, foi realizada uma análise de variância unifatorial e, para separação das médias, foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Para os parâmetros hematológicos, foi também realizado um teste T entre as determinações feitas antes e depois da infecção. Para esta análise, também foi adotado o nível de significância de 5%.

Para os dados da análise das variáveis do status antioxidantes, resultantes dos tratamentos 0%, 25%, 50%, 75%, 100% orgânico, 100% inorgânico e o grupo de peixes não infectados (PBS), foi realizado uma análise de variância unifatorial, com nível de significância de 5%. Os dados resultantes dos tratamentos 0%, 25%, 50%, 75% e 100% orgânico foram comparados com os dados do tratamento 100% inorgânico e todos os tratamentos comparados com os peixes não infectados (PBS).

3. Resultados

3.1. Mortalidade e sinais clínicos

Todas as tilápias do grupo controle, que receberam somente injeção de solução salina de tampão fosfato (PBS), sobreviveram. Como apresentado pela Figura 2, a mortalidade iniciou em 24 h após a infecção nas tilápias alimentadas com as dietas 0%, 25% e 50%. Os sinais clínicos observados com 24 h foram: escurecimento da pele, letargia e falta de apetite, hemorragias na base das nadadeiras pélvicas e peitorais e perda de escamas. Após 48 h, houve mortalidade nos peixes submetidos a todos os tratamentos, com destaque para o tratamento 25%, que apresentou o maior percentual de mortalidade. Já as tilápias alimentadas com a dieta do tratamento 75% apresentaram o menor percentual de mortalidade com 48 h após infecção. De três dias a oito dias após a infecção, a mortalidade cumulativa das tilápias alimentadas com a dieta 100% orgânico foi significativamente maior seguida pelas dietas contendo 25% e 100% inorgânico e o menor percentual de mortalidade ao final do desafio foi atribuído ao tratamento 50%. Os sinais observados ao final do desafio incluem úlceras necrotizantes rasas a profundas e distensão abdominal com fluidos sero-hemorrágicos, natação errática e exoftalmia ocular bilateral e unilateral (Figura 3).

Figura 2. Mortalidade cumulativa da tilápia-do-nilo alimentada com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, após desafio bacteriano

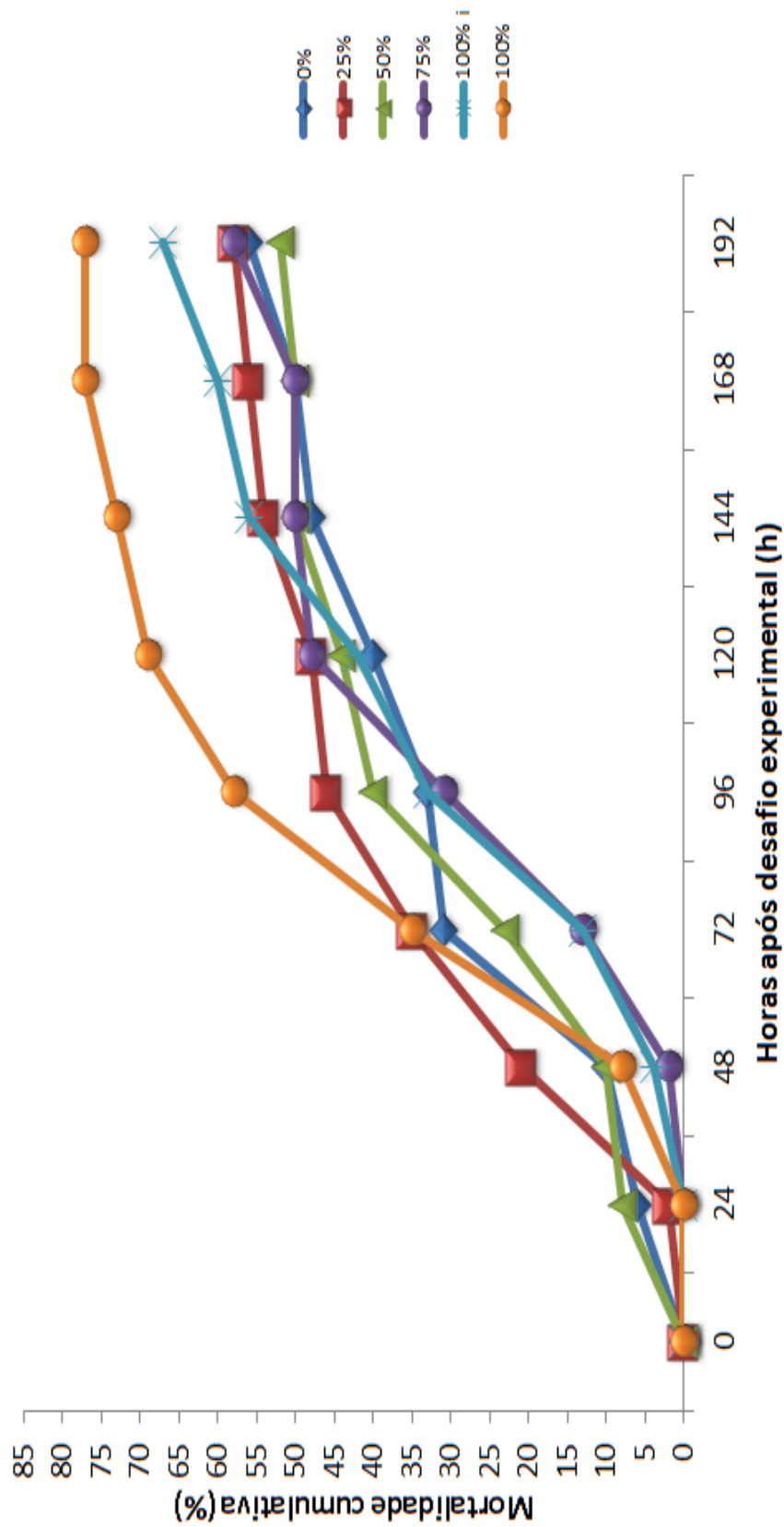


Figura 3. Sinais clínicos observados durante o desafio bacteriano: Peixe 1. Opacidade ocular; Peixe 2. Escurecimento da pele; Peixe 3. Perda de escamas e ascite; Peixe 4. Hemorragia na base da nadadeira peitoral; Peixe 5. Exoftalmia unilateral e ascite; Peixe 6. Necrose da nadadeira peitoral; Peixe 7. Exoftalmia bilateral; Peixes 8 e 9. Hemorragia interna.



3.2. Efeito da infecção nos parâmetros celulares imunológicos não específicos

3.2.1. Eritrograma

O hematócrito, hemoglobina corpuscular média (HCM) e proteína plasmática total (PPT) foram afetados pelas dietas suplementadas com os diferentes níveis de minerais orgânicos (Tabela 3) quando feita a análise de regressão entre os tratamentos 0%, 25%, 50%, 75% e 100% orgânico depois da infecção. Para as diferentes fontes de minerais (0%, 100% orgânico e 100% inorgânico), quando feita à análise de variância, o eritrócito, após infecção, apresentou o maior valor para o tratamento 100% inorgânico e a hemoglobina corpuscular média (HCM) antes da infecção foi mais expressiva para o tratamento 100% orgânico (Tabela 4). Quando foi realizado teste T em todos os tratamentos, entre os valores de antes da infecção e depois da infecção nos mesmos tratamentos, foram encontradas diferenças significativas para a redução dos valores do eritrócito, hematócrito e taxa de hemoglobina (Tabelas 3 e 4).

De outra forma, quando comparado os valores de eritrócitos, porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina, volume médio corpuscular (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), proteína plasmática total (PPT) dos tratamentos suplementados com Bioplex com os tratamentos 100% inorgânico, após infecção (120 h), não houve diferença significativa, somente quando comparamos com os peixes não infectados (PBS) é que diferenças significativas são encontradas para os tratamentos 50% e 75%, para a taxa de hemoglobina, pela análise de variância após a infecção (Figura 4).

Tabela 3. Valores médios do eritograma e proteína plasmática total (PPT) de juvenis de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*.

Variáveis ¹	Infecção	BIOPLEX-Tr-Se-Peixe [®] ,%					Valor de p ²
		0	25	50	75	100	
RBC (10 ⁶ .µL ⁻¹)	antes	2,18a ³	1,98a	2,10a	2,04a	1,85a	>0,05
	depois	1,20b	1,55b	1,47b	1,56b	1,28b	>0,05
Ht (%)	antes	31,38a	31,33a	32,88a	31,06a	30,82a	>0,05
	depois	21,00b	24,44b	20,33b	23,89b	18,56b	0,0385
Hb (g,dL ⁻¹)	antes	9,711a	9,49a	9,04a	9,29a	9,28a	>0,05
	depois	4,85b	5,16b	4,51b	5,12b	4,35b	>0,05
VCM (fL) NS	antes	152,27	163,27	170,78	146,23	167,05	>0,05
	depois	180,11	161,99	143,21	157,51	143,06	>0,05
HCM (pg)	antes	38,67	49,30	37,62	47,59	47,05	>0,05
	depois	42,50	33,83	33,83	34,06	33,72	0,0135
CHCM (g,dL ⁻¹)	antes	32,57	31,07	27,95	30,44	30,11	>0,05
	depois	23,65	21,39	22,11	21,89	23,90	>0,05
PPT (g,dL ⁻¹)	antes	4,93	5,03	5,19	4,80	5,18	>0,05
	depois	4,55	4,62	4,20	4,13	4,22	0,0376
Glicose (mg/dL)	antes	42,80	38,13	38,75	38,07	39,53	>0,05
	depois	55,22	66,56	60,11	56,67	49,86	>0,05

¹RBC=eritrócitos, Ht=porcentagem de hematócrito, Hb=taxa de hemoglobina, VCM=volume médio corpuscular, HCM=hemoglobina corpuscular média, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteína plasmática total.

² Os valores de p correspondem à análise de regressão para a linha.

³As letras minúsculas (a, b) correspondem a diferenças significativas para os mesmos tratamentos quando comparados os valores, antes e depois da infecção, pelo teste T.

Tabela 4. Valores médios do eritograma, proteína plasmática total (PPT) e glicose de juvenis de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas com 100% orgânico, sem suplementação (0%) e 100% inorgânico, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*.

Variáveis ¹	Desafio	Suplementação, %			Valor de p ²
		0	100 Orgânico	100 Inorgânico	
RBC (10 ⁶ .µL ⁻¹)	antes	2,19A ³	1,85A	2,19A	>0,05
	depois	1,2 bB	1,28 bB	1,58 aB	0,0198
Ht (%)	antes	31,39	30,82	31,71	>0,05
	depois	21,00	18,56	23,67	>0,05
Hb (g.dL ⁻¹)	antes	9,71	9,28	8,52	>0,05
	depois	4,86	4,35	5,17	>0,05
VCM (fL)	antes	152,28	167,05	148,74	>0,05
	depois	180,12	143,06	153,34	>0,05
HCM (pg)	antes	38,67b	47,05a	37,28b	0,0240
	depois	42,5	33,72	32,42	>0,05
CHCM (g.dL ⁻¹)	antes	32,57	30,11	27,22	>0,05
	depois	23,66	23,90	23,23	>0,05
PPT (g.dL ⁻¹)	antes	4,94	5,18	5,18	>0,05
	depois	4,56	4,22	4,22	>0,05
Glicose (mg/dL)	antes	42,80	39,53	36,28	>0,05
	depois	55,22	49,86	51,25	>0,05

¹RBC=eritrócitos, Ht=porcentagem de hematócrito, Hb=taxa de hemoglobina, VCM=volume médio corpuscular, HCM=hemoglobina corpuscular média, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteína plasmática total.

² Os valores de p correspondem à ANOVA na linha e as diferenças são apresentadas pelas letras minúsculas (a, b).

³ As letras maiúsculas (A, B) correspondem a diferenças significativas, quando comparados os valores, antes e depois da infecção, pelo teste T.

3.2.2. Trombograma e Leucograma

Os trombócitos, leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e células imaturas não foram afetados pelas dietas suplementadas com os diferentes níveis de minerais orgânicos (Tabela 5) quando feita a análise de regressão entre os tratamentos 0%, 25%, 50%, 75% e 100% orgânico antes e depois da infecção. Para as diferentes fontes de minerais (0%, 100% orgânico e 100% inorgânico), quando feita à análise de variância, não houve diferenças significativas (Tabela 6). Quando foi realizado

teste T em todos os tratamentos, entre os valores de antes da infecção e depois da infecção nos mesmos tratamentos, foram encontradas diferenças significativas para a redução dos valores de trombócitos, leucócitos e linfócitos assim como aumento significativo para os valores de neutrófilos, monócitos e células imaturas (Tabela 5 e 6). Os valores de trombócitos, leucócitos e para diferentes leucócitos os linfócitos, eritrócitos e monócitos quando aplicado o teste T

Quando comparado os valores de trombócitos, leucócitos, Linfócitos, neutrófilos, monócitos e células imaturas dos tratamentos suplementados com minerais orgânicos com o tratamento 100% inorgânico, após infecção (120 h), não houve diferença significativa, somente quando comparamos com os peixes não infectados (PBS) é que diferenças significativas são encontradas para os tratamentos 0%, 25%, 50%, 75%, 100% orgânico e 100% inorgânico, para os linfócitos, pela análise de variância após a infecção (Figura 5).

Tabela 5. Valores médios dos parâmetros dos trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e células imaturas de juvenis de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*.

Variáveis	Desafio	BIOPLEX-Tr-Se-Peixe™, %					Valor de p ¹
		0	25	50	75	100	
Trombócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	18,46A ²	13,13A	15,51A	15,79A	13,44A	>0,05
	depois	1,33B	3,48B	0,07B	1,68B	0,58B	>0,05
Leucócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	10,93	9,91	10,49	10,22	10,93	>0,05
	depois	6,00	7,75	7,37	7,78	5,67	>0,05
Linfócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	9,36A	8,45A	9,20A	8,53A	7,94A	>0,05
	depois	2,00B	2,68B	2,25B	2,26B	1,36B	>0,05
Neutrófilos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	0,78B	0,77B	0,75B	0,86B	0,74B	>0,05
	depois	1,87A	3,66A	3,02A	3,26A	2,82A	>0,05
Monócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	0,76B	0,63B	0,49B	0,81B	0,59B	>0,05
	depois	1,55A	1,27A	2,0A	2,12A	1,46A	>0,05
Células imaturas (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	0,00B	0,00B	0,00B	0,00B	0,00B	>0,05
	depois	0,56A	0,43A	0,07A	0,39A	0,10A	>0,05

¹ Os valores de p correspondem à análise de regressão para linha.

² As letras maiúsculas (A, B) correspondem a diferenças significativas para os mesmos tratamentos quando comparados os valores, antes e depois da infecção, pelo teste T.

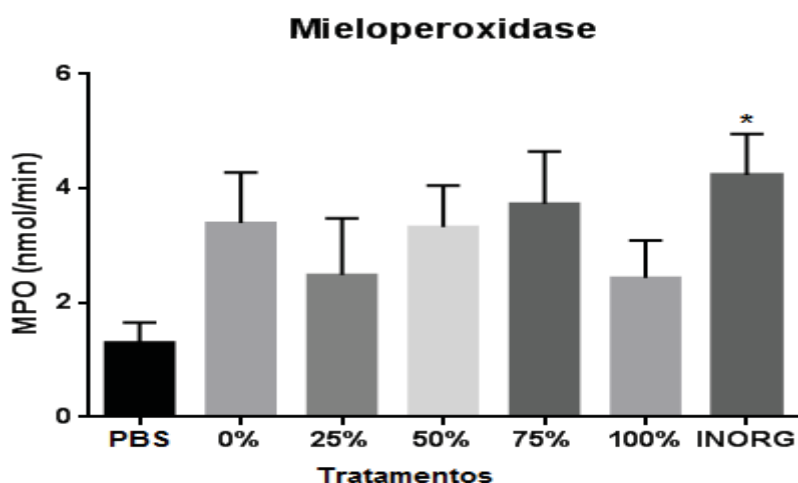
Tabela 6. Valores médios dos parâmetros dos trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e células imaturas de juvenis de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*.

Variáveis	Desafio	Suplementação, %			Valor de p ¹
		0	100 Orgânico	100 Inorgânico	
Trombócito (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	18,46A ²	13,44A	20,59A	>0,05
	depois	1,33B	0,58B	2,90B	>0,05
Leucócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	10,93	10,93	9,23	>0,05
	depois	6,00	5,67	5,27	>0,05
Linfócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	9,36A	7,94A	8,90A	>0,05
	depois	2,00B	1,36B	1,48B	>0,05
Neutrófilos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	0,78A	0,74A	1,07A	>0,05
	depois	1,87B	2,82B	2,24B	>0,05
Monócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	0,76A	0,59	0,98A	>0,05
	depois	1,55B	1,46	1,48B	>0,05
Células imaturas (x10 ³ µL ⁻¹)	antes	0,00A	0,00A	0,00A	>0,05
	depois	0,56B	0,10B	0,11B	>0,05

¹ Os valores de p correspondem à análise de variância na linha para antes e depois da infecção.

² As letras maiúsculas (A, B) correspondem a diferenças significativas quando comparados os valores, antes e depois do desafio, pelo teste T.

Figura 4. Atividade da mieloperoxidase em amostras de sangue de tilápia-do-nylo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Após uma análise de variância unifatorial, os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS). Os valores são apresentados como média + SEM e as diferenças são indicadas como * ($p < 0,05$) e quando comparados com o grupo 100% inorgânico, sem o grupo PBS, não houve diferenças significativas.



3.3. Efeito da infecção nos parâmetros humorais não específicos

Os diferentes níveis de suplementação de mineral orgânico não afetaram significativamente as variáveis da proteína sérica total, imunoglobulina, título aglutinante e atividade antimicrobial, quando realizado a análise de regressão (Tabela 7). Da mesma forma, estas variáveis não diferem entre os peixes alimentados com as dietas suplementadas com 100% minerais inorgânicos, 100% minerais orgânicos ou 0% suplementação mineral, quando realizado a análise de variância (Tabela 8). Quando comparados os tratamentos 0%, 25%, 50%, 75% e 100% orgânico com o tratamento 100% inorgânico e com os peixes não infectados (PBS) pela análise de variância, não se observa diferenças significativas. Para a atividade da mieloperoxidase plasmática (Figura 6) após uma análise de variância entre os tratamentos 0%, 25%, 50%, 75%, 100% orgânico e 100% inorgânico, e quando comparados com os peixes não infectados (PBS) somente o tratamento 100% inorgânico apresenta diferença significativa.

Tabela 7. Valores médios da proteína sérica total, imunoglobulinas, título de aglutinação e atividade antimicrobiana de juvenis de tilápia-do-nylo, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de minerais orgânicos, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*.

Variáveis	Desafio	BIOPLEX-Tr-Se-Peixe TM , %					Valor de p ¹
		0	25	50	75	100	
Proteína sérica total (mg.mL ⁻¹)	antes	34,10	35,4	37,9	35,9	47,62	>0,05
	depois	34,3	35,4	30,57	28,6	26,73	>0,05
Imunoglobulina (mg.mL ⁻¹)	antes	13,40	20,4	21,1	20,7	30,68	>0,05
	depois	19,30	19,13	18,3	16,1	11,34	>0,05
Agglutinação (log ^{2(x+1)})	antes	4,09	3,98	4,08	3,82	3,92	>0,05
	depois	3,11	3,11	3,72	3,11	3,70	>0,05
Antimicrobial (log ^{2(x+1)})	antes	3,79	3,41	3,37	3,25	3,33	>0,05
	depois	4,78	5,57	4,60	4,60	4,78	>0,05

¹ Os valores de p correspondem à análise de regressão para linha.

Tabela 8. Análise de variância dos valores médios da proteína sérica total, imunoglobulinas (Ig), título de aglutinação e atividade antimicrobiana de juvenis de tilápia-do-nylo, alimentadas com dietas suplementadas com 100% orgânico, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, antes e depois da infecção com *Streptococcus agalactiae*.

Variáveis	Desafio	Suplementação, %			Valor de p ¹
		0	100 Orgânico	100 Inorgânico	
Proteína total sérica (mg.mL ⁻¹)	antes	34,1	47,62	37,23	>0,05
	depois	34,3	26,73	27,48	>0,05
Imunoglobulina (mg.mL ⁻¹)	antes	18,2	30,68	21,44	>0,05
	depois	19,3	11,34	14,84	>0,05
Agglutinação (log ^{2(x+1)})	antes	4,08	3,92	4,39	>0,05
	depois	3,11	3,70	3,70	>0,05
Antimicrobial (log ^{2(x+1)})	antes	3,79	3,33	3,41	>0,05
	depois	4,78	4,78	4,91	>0,05

¹ Os valores de p correspondem à análise de regressão para linha.

3.4. Efeito da infecção nos parâmetros antioxidativos

3.4.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Não foram detectadas diferenças significativas quando feita a análise de variância para a atividade da Superóxido dismutase (SOD₁, SOD₂ e T-SOD) alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, após desafio bacteriano (Tabela 9). Para a análise de variância entre os tratamentos sem suplementação (0%), 100% orgânico e 100% inorgânico, para a SOD₂, encontrou-se diferença significativa (Figura 7), com a melhor atividade para o tratamento com 100% Bioplex. A mesma resposta foi obtida quando considerou-se apenas os peixes infectados, ou seja, excluindo-se o grupo não infectado (PBS) da análise de variância.

Tabela 9. Média da atividade da Superóxido dismutase (SOD₁, SOD₂ e T-SOD) em amostras de fígado de tilápia-do-nilo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção.

SOD	BIOPLEX-Tr-Se-Peixe™, %					100% Inor- gânico	PBS ¹	Valor de p ²
	0	25	50	75	100			
SOD ₁	171,84	235,01	237,85	287,41	165,72	265,00	203,49	>0,05
SOD ₂	27,15	28,01	34,22	27,98	46,54	28,78	26,43	>0,05
T-SOD	196,06	252,95	286,46	311,92	217,70	289,91	277,66	>0,05

¹ Grupo não infectado, injetado somente com solução salina de tampão fosfato (PBS)

² Os valores de p correspondem à ANOVA na linha.

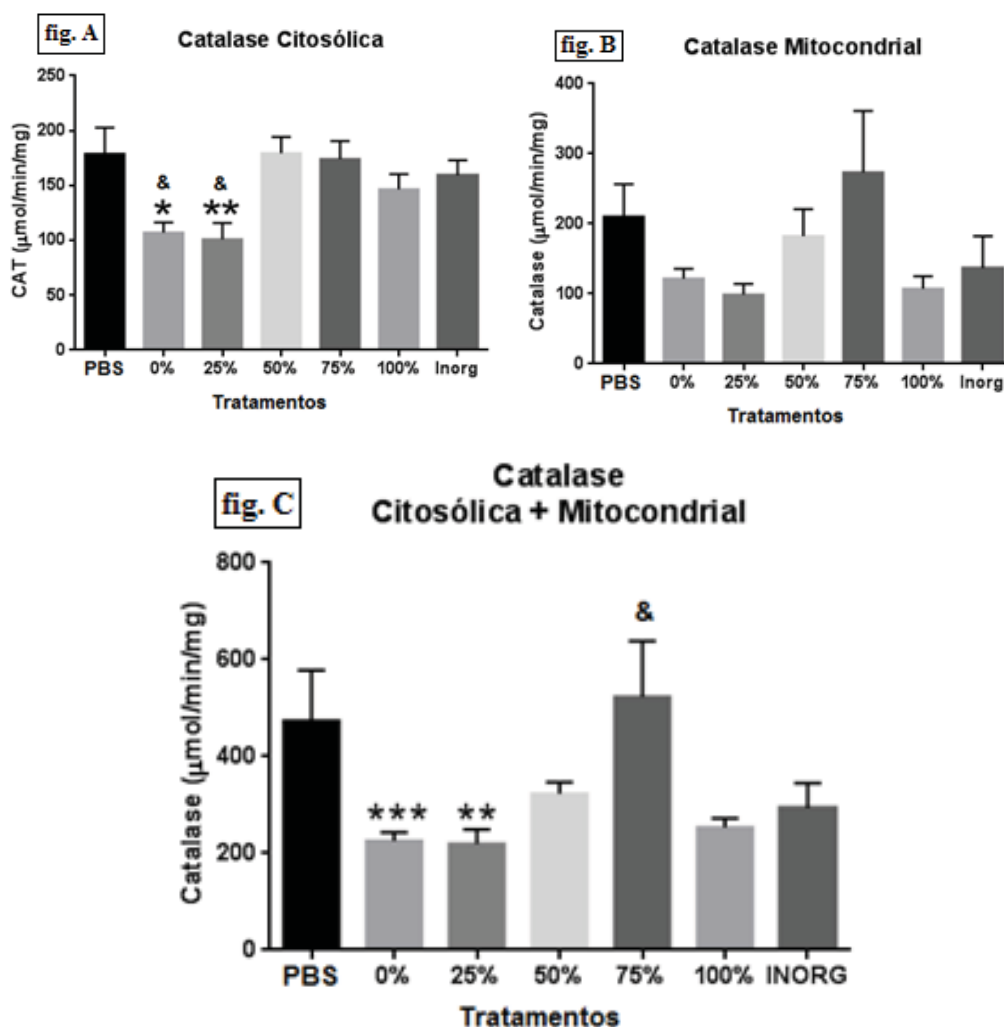
3.4.2. Atividade da Catalase (CAT)

A catalase citosólica foi menor nos tratamentos 0% e 25%, em comparação com o grupo não infectado PBS (Figura A). Já a catalase mitocondrial apresentou apenas uma tendência de diminuição dos valores nos tratamentos 0%, 25%, 100% orgânico e 100% inorgânico (Figura B).

Quando a análise de variância unifatorial foi realizada apenas entre os peixes infectados, foram encontradas diferenças, com menor atividade da catalase citosólica, para os grupos 0% e 25%, em relação ao grupo 100%

inorgânico. Diferenças estatísticas não foram detectadas na atividade da catalase mitocondrial, enquanto a atividade da catalase total apresentou valores maiores nas tilápias alimentadas com a dieta do tratamento 75%, em comparação ao tratamento 100% inorgânica (Figura C).

Figura 5. Atividade da enzima catalase em amostras de fígado de tilápia-do-nylo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Após uma análise de variância unifatorial, os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS). Os valores são apresentados como média + SEM e as diferenças são indicadas como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). Quando comparados com o grupo 100% inorgânico, sem o grupo PBS, as diferenças são indicadas como & ($p < 0,05$). **A)** Atividade na fração citosólica, **B)** Atividade na fração celular enriquecida em mitocôndrias e peroxissomos e **C)** Atividade em ambas as frações.

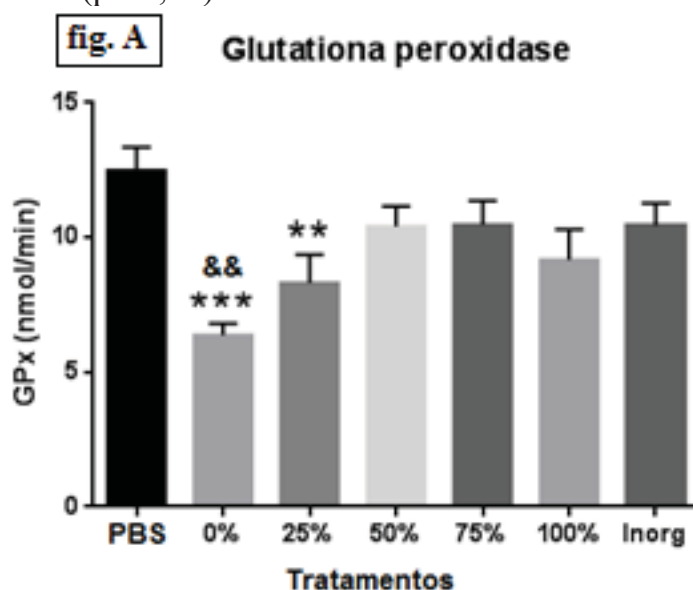


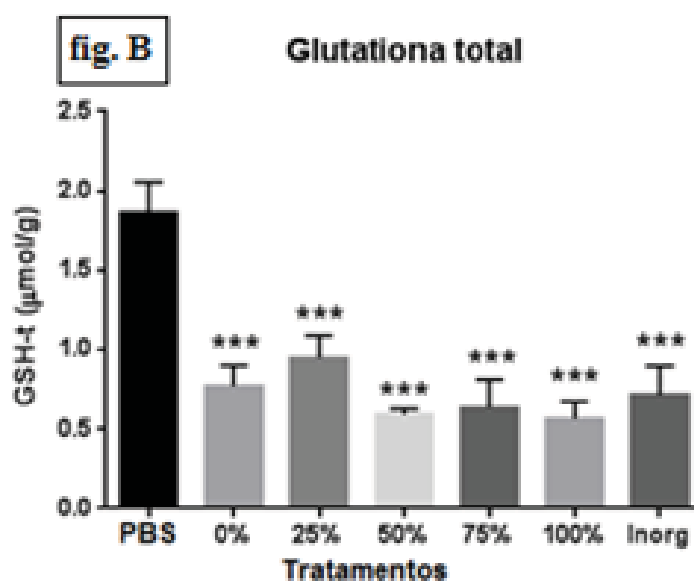
3.4.3. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da glutathiona peroxidase diminuiu significativamente após o desafio nas tilápias alimentadas com as dietas sem suplementação mineral (0%), ou suplementação de 25% e 100% orgânico. Na comparação entre os animais infectados, comparados com o tratamento 100% inorgânico, sem o grupo PBS (Figura A), encontrou-se diferença estatística em relação ao tratamento 0%, apresentando menor atividade para este tratamento, mas não para os demais grupos. Quando realizada a regressão entre os tratamentos suplementados com os níveis de minerais orgânicos, não houve diferença significativa entre os níveis.

Já os níveis de glutathiona total foram reduzidos para cerca de 40% dos valores obtidos em peixes não infectados (Figura B), sendo este um marcador muito sensível de estresse oxidativo, após o desafio bacteriano. Nos peixes infectados, não houve diferenças entre os grupos. Todos os grupos apresentaram uma extensão similar da perda de GSH-total no fígado ($\approx 60\%$), a qual não diferiu entre os peixes alimentados com os diferentes tratamentos.

Figura 6. Níveis de glutathiona peroxidase (GPx) (A) e glutathiona total (GSH-t = GSH + GSSH em GSH-equivalentes) (B) em amostras de fígado de tilápia-do-nilo alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Após uma análise de variância unifatorial, os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS). Os valores são apresentados como média \pm SEM e as diferenças são indicadas como ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). Quando comparados com o grupo 100% inorgânico, sem o grupo PBS, as diferenças são indicadas como && ($p < 0,01$).





3.5. Marcadores do estresse oxidativo

3.5.1. Ensaio cometa

Considerando-se somente os peixes infectados, não houve diferença significativa entre as diferentes suplementações minerais. Apesar de um aparente menor dano oxidativo ao DNA nos tratamentos 50% e 75%, bem como no tratamento 100% inorgânico (Figura 10). As diferenças só são observadas quando comparados com o grupo não infectado (PBS). Na análise de regressão entre os tratamentos suplementados com minerais orgânicos, foi detectada uma relação entre os danos oxidativos ao DNA com os níveis de suplementação, considerando-se somente os peixes infectados (Figura 11)

Figura 7. Análise de variância do índice de dano oxidativo ao DNA no ensaio Cometa, em eritrócitos em tilápia-do-nilo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS). Os valores são apresentados como média + SEM e as diferenças são indicadas como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) e quando comparados com o grupo 100% inorgânico, sem o grupo PBS, não apresentaram diferenças significativa.

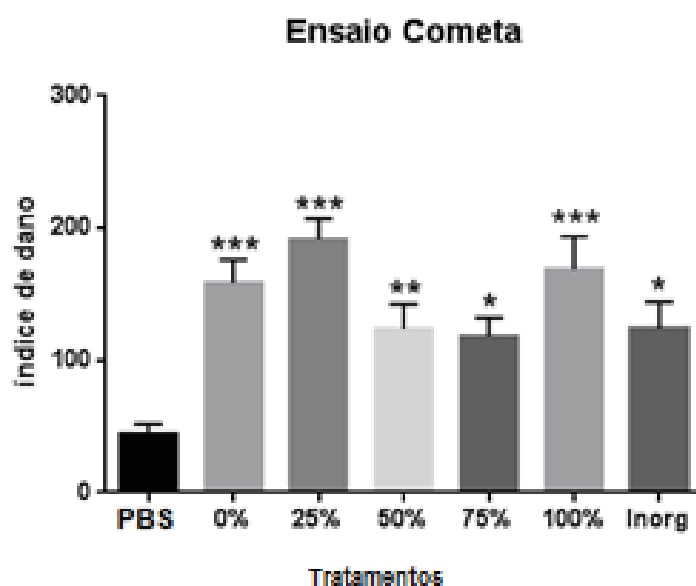
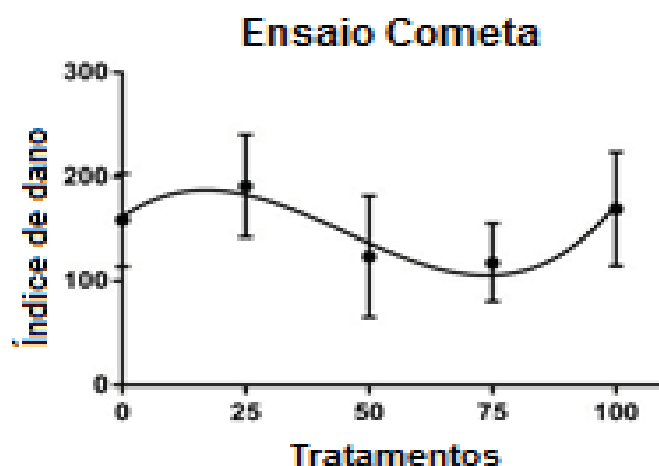


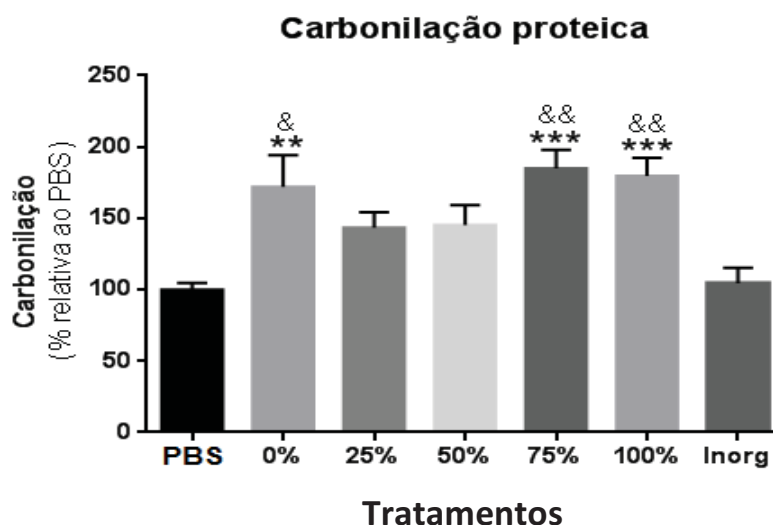
Figura 8. Análise de regressão do índice de dano oxidativo ao DNA no ensaio Cometa, em eritrócitos de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com vários níveis de minerais orgânicos, após desafio com *Streptococcus agalactiae*.



3.5.2. *Adutos de carbonila*

Quando comparado às tilápias não infectadas (PBS), o conteúdo de proteína carbonilada aumentou nos tratamentos 0%, 25% e 75%, mas não naqueles alimentados com a dieta 100% inorgânica e 50% orgânico (Figura 12). Já quando a análise de variância unifatorial foi realizada apenas entre os peixes infectados, os grupos 0%, 75% e 100% orgânico, foram maiores em relação à dieta 100% inorgânica, mas não para o tratamento 50% (Figura 12).

Figura 9. Análise de variância de Carbonilação de proteínas em amostras de fígado de tilápia-do-nylo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Após uma análise de variância unifatorial, os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS), e as diferenças estão indicadas como **($p < 0,01$) e, ***($p < 0,001$); ou por & ($p < 0,05$) ou && ($p < 0,01$). Os valores são apresentados como média + SEM.



3.6. *Efeito da infecção nos danos hepáticos*

As enzimas marcadoras de danos hepáticos aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) não foram afetadas pelos níveis de suplementação na análise de regressão entre os níveis de Bioplex, assim como para a análise de variância entre os tratamentos 0%, 100% orgânico e 100% inorgânico. Também não houve diferença quando estes grupos foram comparados com o grupo de peixes não infectados (Tabela 10).

Tabela 10. ALT e AST do plasma em tilápia-do-nilo, alimentadas com diferentes níveis de suplementação de minerais orgânicos, sem suplementação mineral (0%) e 100% inorgânico, depois da infecção. Os valores médios foram comparados com peixes não infectados (PBS).

Variáveis	BIOPLEX-Tr-Se-Peixe™, %					100% Inorgânico	PBS ¹	Valor de p ²
	0	25	50	75	100			
ALT	4,19	3,44	3,91	8,34	4,53	6,59	3,97	>0,05
AST	2,15	1,75	2,20	2,36	1,65	2,00	1,76	>0,05

¹ Grupo não infectado, injetado somente com solução salina de tampão fosfato (PBS)

² Os valores de p correspondem à ANOVA na linha.

4. Discussão

Os patógenos bacterianos são onipresentes nos diversos tipos de sistemas aquícolas e são a causa de grandes perdas econômicas. Porém, essas perdas só ocorrem por uma soma de fatores que levam ao estresse dos peixes e, conseqüentemente, à instalação da infecção. Exemplos destes fatores são as práticas de manejo adotadas durante o ciclo produtivo, o que pode ser potencializado se o peixe estiver com alguma deficiência nutricional. Por outro lado, se a dieta suprir suas exigências nutricionais, o peixe terá grandes chances de reverter os agentes estressores durante o ciclo produtivo, sem afetar significativamente sua homeostase fisiológica. Desta forma, se prevenirá a instalação de doenças infecciosas. Muitos minerais têm funções biológicas que afetam o sistema imunológico do hospedeiro e auxiliam nos mecanismos de defesa.

Com exceção do ferro, pouco se sabe sobre os efeitos dos outros oligoelementos dietéticos alvo deste estudo (manganês, zinco, selênio e cobre) na imunidade e resistência a doenças em peixes. Alguns estudos sobre esses microminerais dietéticos relatam o quanto estes são essenciais para as respostas imunes, não somente para a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), mas também para outras espécies e com outros patógenos [37-46].

O efeito nocivo da infecção causada pela bactéria *Streptococcus agalactiae* à tilápia foi aqui observado, com claras evidências nas alterações fisiológicas e mortalidade. Todas as tilápias do grupo controle, que receberam somente injeção de solução salina de tampão fosfato, sobreviveram. Já a mortalidade cumulativa dos peixes suplementados do tratamento 50% foi a menor, enquanto que os peixes alimentados com as

dietas 100% orgânico e 100% inorgânico apresentaram maior percentual de mortalidade.

Alterações no perfil hematológico de espécies de peixes são frequentemente observadas em estudos de suplementação dietética de minerais, tanto em níveis abaixo ou acima da exigência nutricional, sendo notadas alterações em diversos parâmetros [47,48]. No presente estudo, antes da infecção, os níveis de suplementação dos minerais orgânicos não desencadearam alterações significativas no perfil hematológico, sugerindo que os níveis obtidos nas dietas foram suficientes para manutenção da hematopoiese adequada.

Antes da infecção, não houve diferença significativa nos parâmetros hemato-imunológicos e glicose, exceto para o HCM que apresentou maior valor para a suplementação 100% orgânica, quando comparada à suplementação 100% inorgânica ou com a ausência de suplementação (0%). Entretanto, o número de eritrócitos presente nos peixes alimentados com a dieta 100% orgânico, antes da infecção, se encontrou abaixo do normal de acordo com Hrubec; Cardinale; Smith,[49]. Os peixes alimentados com dietas com ausência de suplementação (0%) apresentaram uma redução de aproximadamente de 45% no número de eritrócitos e um aumento do volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM).

Após o desafio bacteriano, registrou-se um quadro de anemia, provavelmente causado por depressão seletiva da eritrogenese [10] em todos os peixes, independente da forma e/ou ausência de suplementação mineral. Isto foi evidenciado pela redução significativa dos números de eritrócitos e hemoglobina, quando comparados com os peixes antes da infecção ou ainda com os mesmos parâmetros relatados anteriormente [49]. Os peixes alimentados com as dietas dos tratamentos 0%, 25%, 50%, 75%, 100% orgânico e 100% inorgânico apresentaram anemia normocítica e hipocrômica. Aqui pode ser descartada a possibilidade que esta anemia tenha sido causada pela falta de ferro (ferropriva), devido à estabilidade dos valores para o índice CHCM, os quais não apresentaram reduções graves em nenhum dos tratamentos [10]. Conforme esperado, tais observações demonstram que o desafio bacteriano foi prejudicial à manutenção do perfil hematológico nos peixes, independente da forma e/ou ausência de suplementação mineral na dieta.

A dieta sem suplementação mineral, que atingiu a exigência mínima de ferro para a tilápia [17], não propiciou hematopoiese adequada após o desafio bacteriano, promovendo os piores quadros hematológicos. Já o menor nível de suplementação orgânica (25%) propiciou algumas melhoras no perfil hematológico, quando comparado aos peixes infectados

que não receberam suplementação mineral. Desta forma, a inclusão em demasia dos minerais na sua forma inorgânica, normalmente observada nas rações comerciais, é justificada pelo melhoramento da biodisponibilidade desses elementos.

A deficiência ou o excesso de ferro na dieta podem afetar adversamente o sistema imunológico. Isso, no entanto, não sugere que a deficiência de ferro, que resulta em anemia, forneça proteção contra doenças infecciosas [50]. Os resultados aqui apresentados confirmam isto, já que o menor percentual de mortalidade foi registrado nos tratamentos com os menores níveis de inclusão de ferro. Embora seja plausível que os organismos anêmicos são mais suscetíveis à infecção do que aqueles alimentados com ferro na suplementação adequada, os resultados de Sealey, Lim e Klesius [40] parecem contradizer essa noção, já que a mortalidade foi semelhante entre os peixes alimentados com dieta deficiente em ferro ou dieta com suplementação adequada na forma inorgânica, após desafio com patógeno.

Apesar dos peixes em todos os tratamentos terem apresentado redução no número de trombócitos após a infecção, essa redução foi ainda mais significativa naqueles alimentados com a dieta suplementada com 50% Bioplex. Isso sugere que os trombócitos também participam eficientemente da resposta imune. Além das funções homeostáticas conhecidas, outros possíveis papéis dos trombócitos na imunidade (incluindo a fagocitose), estão presentes em diferentes grupos animais, incluindo os peixes [51,52]. Nos últimos anos, propriedades fagocíticas também foram atribuídas a células dendríticas teleósticas, linfócitos e trombócitos [53]. Apesar de possuir uma capacidade baixa de interiorizar partículas, os trombócitos são as segundas células sanguíneas mais abundantes, após os eritrócitos, em peixes.

Variações no leucograma foram observadas em todos os peixes, independente da suplementação, em particular para aqueles alimentados com 100% orgânico ou sem suplementação, devido, principalmente, à redução significativa do número de linfócitos (linfopenia). Basófilos e eosinófilos não foram encontrados no decorrer do experimento. O número de células imaturas (CI) aumentou nos peixes infectados. O tempo após a infecção, quando foram amostrados estes parâmetros (120 h), pode ter sido determinante para o quadro hematológico dos peixes infectados.

Atualmente se reconhece que a mieloperoxidase (MPO) pode ter uma participação mais ampla na bioquímica dos neutrófilos e monócitos. Além de sua atividade microbicida, pode também ter um papel na imunomodulação [54]. No presente estudo, a atividade da mieloperoxidase sérica nos peixes alimentados com suplementação 100% inorgânica foi

maior somente quando comparada àquela apresentada nos peixes não infectados. Foi previamente relatado que a deficiência de ferro é responsável pela redução da atividade de várias enzimas, incluindo a mieloperoxidase [55,56]. Ainda, foi relatada tendência para o aumento da atividade de explosão respiratória, atividade mieloperoxidase e atividade bactericida em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), quando alimentado com dieta contendo óxido de ferro nanoestruturado (nano-Fe) (Behera et al. 2013). Porém, minerais orgânicos são mais eficazes que formas inorgânicas e nanometais na promoção da mineralização e resistência ao estresse [57].

Os microminerais da dieta podem afetar a fisiologia da tilápia, aumentando também à resistência contra infecções bacterianas via a atividade das enzimas diretamente envolvidas na neutralização do efeito deletério de ERO, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A infecção experimental demonstrou claramente um efeito negativo nos níveis de glutathione (GSH-t), uma vez que ocasionou a diminuição para além de 50%, em todos os grupos. Isto demonstra que a atividade da GPx é um marcador muito sensível de estresse oxidativo, quando os peixes estão infectados. Entretanto, a GSH-t não permitiu a discriminação entre os tratamentos dietéticos, após o desafio. Da mesma forma, todos os peixes infectados experimentalmente apresentaram menor conteúdo de hemoglobina, quando comparados aos peixes injetados somente com solução salina de tampão fosfato, mas também não houve diferenças significativas entre os grupos infectados.

Para avaliar a SOD citosólica e a SOD mitocondrial, foi utilizada a centrifugação diferencial. O pellet de 20.000 x g foi usado como a fração enriquecida em mitocôndria e peroxissomos, representando a Mn-SOD (SOD₂), o sobrenadante foi tomado como a fração citosólica, representando a Cu / Zn-SOD (SOD₁) e a soma da atividade mitocondrial mais citosólica a SOD total (T-SOD). Diferenças só foram detectadas quando feita a análise de variância entre o tratamento não suplementado (0%), 100% orgânico e 100% inorgânico, apresentando maior atividade para a SOD₂ no tratamento com 100% orgânico. Em estudos realizados com truta arco-íris (*Onchoryncus mykiss*) [58] e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) [59] foi relatada redução na atividade da SOD₂, quando os peixes foram alimentados com dietas deficientes em manganês. Já para a tilápia híbrida (*O. niloticus* × *O. aureus*), a atividade da SOD₂ aumentou, quando alimentada com dietas suplementadas com manganês [60].

A atividade da catalase na fração citosólica, apresentou uma diminuição nos tratamentos 25% e não suplementado (0%), em comparação aos peixes que receberam apenas solução salina de fosfato tampão (PBS). Diferenças foram observadas quando comparados todos os tratamentos com

o 100% inorgânico, menos os peixes não infectados (PBS), onde o tratamento 75% apresentou a maior atividade para catalase total (citossólica mais mitocondrial). Esta tendência foi mantida na catalase mitocondrial, mas as diferenças foram significativas apenas para a catalase total e com diminuição da atividade para os tratamentos 25% e não suplementado (0%).

Essa mesma tendência foi observada na atividade da GPx, onde os tratamentos 25% e não suplementado (0%) apresentaram menor atividade da GPx, mas sem diferenças para os outros tratamentos, quando comparados com o grupo não infectado (PBS). Já foi relatado que níveis de suplementação com selênio (mesmo na forma inorgânica) propiciam o aumento na atividade da GPx, para outras espécies não infectadas. Por exemplo, em estudo com truta arco-íris (*Onchoryncus mykiss*) foi relatado que a suplementação de selênio inorgânico na dieta propiciou maior atividade da GPx no plasma [61]. O mesmo foi relatado para o matrinxã (*Brycon cephalus*) [62] e para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) [39,63].

No presente estudo, a dieta 0%, que apresentam redução de 35% no nível de selênio em comparação ao 100% inorgânico, a atividade da GPx é reduzida significativamente entre os peixes infectados. Porém com as fontes orgânicas, no menor nível suplementado (25%) - que difere em 15% a mais no nível de selênio com o tratamento sem suplementação orgânica (0%) e 23% menos em comparação com a suplementação 100% inorgânico - não apresenta diferença significativa quando comparado com a dieta 100% inorgânico, sugerindo maior eficiência na suplementação com a fonte orgânica, provavelmente mais biodisponível.

Considerando-se o índice de dano oxidativo ao DNA (ensaio Cometa), surge o mesmo padrão geral relatado anteriormente para as enzimas antioxidantes, no qual os tratamentos 25% e não suplementado (0%) apresentaram níveis elevados de dano oxidativo. Enquanto que, na carbonilação proteica, apenas o grupo sem suplementação mineral (0%) apresentou significativamente maior dano oxidativo proteico.

O fígado é o principal local de acumulação de selênio [64] e a degeneração do tecido hepático é relatada em peixes expostos a elevadas doses deste mineral traço [65]. Porém, no presente estudo não houve diferença significativa para os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), mesmo nos grupos alimentados com níveis mais elevados de suplementação mineral. Isto pode ser um indício de que as suplementações não geraram um efeito tóxico, o que teria causado a liberação dessas enzimas do fígado [66].

Por outro lado o efeito dos níveis baixos de certos minerais também podem desencadear danos hepáticos, como já foi relatado para

tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), com a suplementação de zinco[67], onde peixes alimentados com dietas deficientes em zinco apresentaram atividades séricas significativamente mais altas para ALT e AST do que aquelas dos grupos alimentados com dietas suplementadas com zinco. Isto sugere que houve possível dano hepático quando alimentada com dieta deficiente em zinco.

A super dosagem dos minerais traço alvo deste estudo não parece ter um efeito positivo sobre a resistência à infecção por *S. agalactiae*. Corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, dietas suplementadas com uma forma inorgânica de ferro (até 1200 mg kg⁻¹) ou heme-Fe (até 300 mg kg⁻¹) não afetaram as respostas imunes não específicas, como atividade bactericida sérica, atividade fagocítica, contagem diferencial de leucócitos ou resistência à infecção no salmão do Atlântico (*Salmo salar*), quando desafiado com *Vibrio anguillarum* [68]. Entretanto, outro estudo com a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) [69], relatou que as atividades de mieloperoxidase (MPO) e superóxido dismutase (SOD) - enzimas que contém ferro e cobre/zinco, respectivamente - mostraram um padrão crescente até a inclusão de 6,31 mg kg⁻¹ de selênio, declinando com níveis de inclusão maiores nos grupos suplementados com fonte inorgânica de selênio.

Já exemplares de bagre de canal alimentados com dieta deficiente em ferro apresentaram a maior porcentagem de mortalidade total, enquanto que, aqueles alimentados com dieta repleta de ferro nas formas inorgânicas e orgânicas (180 mg Fe kg⁻¹), apresentaram mortalidade somente no quinto dia após o desafio[40]. No entanto, sete dias pós-desafio, ambos os tipos de suplementação, ou seja, na forma orgânica e inorgânica, promoveram 100% de mortalidade e a dieta com Fe na forma orgânica (60 mg Fe kg⁻¹) promoveu a menor mortalidade. A suplementação de Mn e Zn em mais de 100 mg kg⁻¹ da dieta não aumentou a resistência do salmão vermelho (*Oncorhynchus nerka*) à doença renal bacteriana de *Renibacterium salmoninarum*[70]. A alta dosagem de Cu na dieta também é tóxica para organismos[71]. Cu dietético pode ligar proteínas e ácidos nucleicos e causar a oxidação de lipídios e proteínas[72]. No entanto não encontramos essa relação já que nos tratamentos com níveis mais elevados de Cu tivemos o menor dano proteico pela carbonilação proteica.

Constata-se, portanto, que ainda não há consenso em relação à superioridade de uma ou outra forma de suplementação de minerais (orgânica *versus* inorgânica), sendo que os resultados variam dependendo do elemento traço alvo do estudo, a resposta analisada e também da espécie de peixe em questão. Encontrar uma fonte ideal e um nível adequado na dieta que sirva também as respostas imunológicas quando desafiados, se

torna ainda mais desafiador quando nos confrontamos com os diferentes níveis dietéticos ideais para os parâmetros imunológicos individuais.

No presente estudo não houve diferença significativa entre os grupos de peixes alimentados com minerais inorgânicos e com 50% orgânico, após desafio, para os indicadores antioxidativos (SOD, GPx, Catalase, GSH-t e danos no DNA ou proteínas). A atividade enzimática foi preservada e a carbonilação de proteínas não foi significativamente aumentada em comparação ao grupo injetado apenas com solução tampão de fosfato. A extensão na diminuição nos níveis de GSH-t e no dano oxidativo ao DNA foi similar entre os peixes alimentados com as dietas 100% inorgânico e 50% orgânico. Considerando-se os diferentes níveis de suplementação com minerais orgânicos, 50% de suplementação foi comparável à dieta contendo a suplementação mineral na forma inorgânica, apresentando os menores efeitos negativos gerais, após a infecção experimental.

No geral, peixes alimentados com dietas sem suplementação mineral ou suplementadas com minerais orgânicos ou ainda com suplemento inorgânico, mostraram sinais de estresse oxidativo quando infectados com *S. agalactiae*. A infecção induziu ao estresse oxidativo grave, como observado pela diminuição da atividade de CAT e GPx nos tratamentos 25% e não suplementado (0%), bem como pela diminuição de GSH-t e aumento do dano oxidativo ao DNA, em todos os grupos infectados, além da oxidação proteica nos grupos alimentados com 0%, 75% e 100% orgânico. Com relação ao tratamento 75%, as atividades das enzimas antioxidantes foram preservadas, principalmente para a atividade da CAT que apresentou a maior atividade na soma das atividades (citossólica e mitocondrial). Entretanto, as proteínas oxidativas e os danos no DNA aumentaram. Isso sugere que esse nível de suplementação de Bioplex tem um efeito intermediário em comparação ao pior resultado, encontrado para os tratamentos 25% e não suplementado (0%).

5. Conclusão

Após desafio bacteriano, os grupos de peixes alimentados com suplementação 50% orgânica (18 mg/kg Cu, 223 mg/kg Fe, 53 mg/kg Zn, 21 mg/kg Se) e o 100% inorgânico (33 mg/kg Cu, 198 mg/kg Fe, 55 mg/kg Zn, 34 mg/kg Mn, 0,70 mg/kg Se) apresentam os menores impactos negativos nas respostas imunes não específicas, bem como na promoção de estresse oxidativo. Portanto, a suplementação de 50% orgânica produz efeitos semelhantes à suplementação com 100% de minerais na forma inorgânica, porém com menores níveis de suplementação mineral.

6. Referências

- [1] P.H. Klesius, C.A. Shoemaker, J.J. Evans, 2008, *Streptococcus*: a worldwide fish health problem, Proceedings from the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 1 (2008) 83-107.
- [2] S.P. Lall, Nutrition and health of fish, Av. En Nutr. Acuicola V. Mem. Del V Simp. Int. Nutr. Acuicola. (2000) 13–23.
- [3] M.J.S. Apines-Amar, S. Satoh, C.M.A. Caipang, V. Kiron, T. Watanabe, T. Aoki, Amino acid-chelate: A better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture. 240 (2004) 345–358. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.01.032.
- [4] J.G. Bell, C.B. Cowey, Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Aquaculture. 81 (1989) 61–68. doi:10.1016/0044-8486(89)90230-5.
- [5] K.T. Le, R. Fotedar, Bioavailability of selenium from different dietary sources in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*), Aquaculture. 420–421 (2014) 57–62. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.10.034.
- [6] T. Paripatananont, R.T. Lovell, Chelated zinc reduces the dietary zinc requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Aquaculture. 133 (1995) 73–82. doi:10.1016/0044-8486(94)00404-C.
- [7] M. V. Do Carmo E Sá, L.E. Pezzato, M.M. Barros, P. De Magalhães Padilha, Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings, Aquac. Nutr. 11 (2005) 273–281. doi:10.1111/j.1365-2095.2005.00352.x.
- [8] T. Paripatananont, R.T. Lovell, Comparative Net Absorption of Chelated and Inorganic Trace Minerals in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Diets, J. World Aquac. Soc. 28 (1997) 62–67. doi:10.1111/j.1749-7345.1997.tb00962.x
- [9] E.F. Hesser, Methods for routine fish hematology, The Progressive Fish-Culturist. 22. (1960) 164–171.

- [10] M.J.T. Ranzini-Paiva, S.B. Pádua, M. Tavares-Dias, M.I. Egami, Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, (2013) 140.
- [11] M. Tavares-Dias, Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista— Jaboticabal, São Paulo, Brazil, (2003).
- [12] T.M. Clauss, A.D.M. Dove, J.E. Arnold, Hematologic Disorders of Fish, Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract. 11 (2008) 445–462. doi:10.1016/j.cvex.2008.03.007.
- [13] J.D. Biller-Takahashi, L.S. Takahashi, F.E. Mingatto, E.C. Urbinati, The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*, Fish Shellfish Immunol. 47 (2015) 360–367. doi:10.1016/j.fsi.2015.09.022.
- [14] L. Tort, Stress and immune modulation in fish, Dev. Comp. Immunol. 35 (2011) 1366–1375. doi:10.1016/j.dci.2011.07.002.
- [15] D.R. Tocher, G. Mourente, A. Van Der Eecken, J.O. Evjemo, E. Diaz, J.G. Bell, I. Geurden, P. Lavens, Y. Olsen, Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) and sea bream (*Sparus aurata L.*), Aquac. Nutr. 8 (2002) 195–207. doi:10.1046/j.1365-2095.2002.00205.x.
- [16] M.A. Hamilton, R.C. Russo, R.V. Thurston, Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. Environ Sci Technol. 11 (1977) 714–719 doi:10.1021/es60130a004
- [17] National Research Council (NRC). Nutrient requirements of fish. Washington, DC: Academy Press; (2011).
- [18] W.M. Furuya, Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. (2010). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

- [19] AOAC - Association of Official Agricultural Chemists, Official
- [20] A.N.M. Ishikawa, M.J.T. Ranzani-Paiva, J. V Lombardi, Total leukocyte counts methods in fish, *Oreochromis niloticus*. Arch. Vet. Sci. 13 (2008) 54–63. doi:10.5380/avs.v13i1.11560.
- [21] M.M. Wintrobe, Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. Folia Haematologica. v.51 (1934) 32-49.
- [22] P.B. Goldenfarb, F.P. Bowyer, Hall and E. Brosious, Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. Am. J. Clin. Pathol. 56(1) (1971) 35–39.
- [23] P.C. Blaxhall, K.W. Daisley, Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol., 5 (1971) 771-781.
- [24] TE. Weichselbaum, An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am. J. Clin. Pathol. 10 (1946) 40-9.
- [25] E.C. Amar, V. Kiron, S. Satoh, N. Okamoto, Effects of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Fish. Sci. 66 (2000) 1068–1075. doi:10.1046/j.1444-2906.2000.00170.x.
- [26] M. Yildirim, C. Lim, P. Wan, P.H. Klesius, Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid. Aquaculture. 219 (2003) 751- 768.
- [27] B.C. Silva, M.L. Martins, A. Jatobá, C.C. Buglione Neto, F.N. Vieira, G. V. Pereira, G.T. Jerônimo, W.Q. Seiffert, J.L.P. Mouriño, Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes, Pesqui. Veterinária Bras. 29 (2009) 874–880. doi:10.1590/S0100-736X2009001100002.

- [28] F. Paoletti, A. Mocali, Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H Oxidation, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 209–220. doi:10.1016/0076-6879(90)86110-H.
- [29] H. Aebi, Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [30] A. Wendel, Glutathione Peroxidase, *Methods Enzymol.* 77 (1981) 325–333. doi:10.1016/S0076-6879(81)77046-0.
- [31] D. Galleman, P. Eyer, Formation of hydrogen peroxide during precipitation of red cells with perchloric acid. A cautionary note for precise determination of pyruvate, GSH, and NAD(P)H. *Anal. Biochem.* 191 (1990) 347–353.
- [32] T.P. Akerboom, H. Sies, Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77 (1981) 373–382.
- [33] G. Ellman, H. Lysko, A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal. Biochem.* 93 (1979) 98–102.
- [34] Deponte, M., 2017. The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures. *Antioxid. Redox Signal.* 27, 1130–1161. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7123>.
- [35] L.P. Singh, Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) and Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 4 (2013). <https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000287>.
- [36] R.L. Levine, J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233 (1994) 346–357.
- [37] C. Lim, W.M. Sealey, P.H. Klesius, Iron methionine and iron sulfate as sources of dietary iron for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. World Aquac. Soc.* 27 (1996) 290-296.

- [38] C. Wang, R.T. Lovell, P.H. Klesius, Response to *Edwardsiella ictaluri* Challenge by Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Fed Organic and Inorganic Sources of Selenium, *J. Aquat. Anim. Health.* 9 (1997) 279–290. doi:10.1577/1548-8667(1997)009.
- [39] C. Wang, R.T. Lovell, Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Aquaculture.* 152 (1997) 223–234. doi:10.1016/S0044-8486(96)01523-2.
- [40] W.M. Sealey, C. Lim, P.H. Klesius, Influence of the Dietary Level of Iron from Iron Methionine and Iron Sulfate on Immune Response and Resistance of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*, *J. World Aquac. Soc.* 28 (1997) 142–149. doi:10.1111/j.1749-7345.1997.tb00849.x.
- [41] C. Lim, P.H. Klesius, Responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed iron-deficient and replete diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge, *Aquaculture.* 157 (1997) 83–93. doi:10.1016/S0044-8486(97)00143-9.
- [42] C. Lim, C.A. Shoemaker, P.H. Klesius, The effect of ascorbic acid on the immune response of fish. In: *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms.* (2001a) 149–166.
- [43] C. Lim, P.H. Klesius, C.D. Webster, The role of dietary phosphorus, zinc and selenium in fish health. In: *Nutrition and Fish Health*, Haworth Press, New York. (2001b) 201–212.
- [44] D. Han, S. Xie, M. Liu, X. Xiao, H. Liu, X. Zhu, Y. Yang, The effects of dietary selenium on growth performances, Oxidative stress and tissue selenium concentration of gibel carp (*Carassius auratus*), *Aquac. Nutr.* 17 (2011). doi:10.1111/j.1365-2095.2010.00841.x.
- [45] L.S. Takahashi, J.D. Biller-Takahashi, C.F.M. Mansano, E.C. Urbinati, R.Y. Gimbo, M.V. Saita, Long-term organic selenium supplementation overcomes the trade-off between immune and antioxidant systems in pacu (*Piaractus mesopotamicus*), *Fish Shellfish Immunol.* 60 (2017) 311–317. doi:10.1016/j.fsi.2016.11.060.

- [46] L. Tang, K. Huang, J. Xie, D. Yu, L. Sun, Q. Huang, Y. Bi, Dietary copper affects antioxidant and immune activity in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*), *Aquac. Nutr.* 23 (2017) 1003–1015. doi:10.1111/anu.12468.
- [47] C. Lim, W.M. Sealey, P.H. Klesius, Iron methionine and iron sulfate as sources of dietary iron for channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *J. World Aquac. Soc.* 27 (1996) 290–296. doi:10.1111/j.1749-7345.1996.tb00610.x
- [48] M. Abdel-Tawwab, M.A.A. Mousa, F.E. Abbass, Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity, *Aquaculture.* 272 (2007) 335–345. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.09.004.
- [49] T.C. Hrubec, J.L. Cardinale, S.A. Smith, Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*), *Vet. Clin. Pathol.* 29 (2000) 7–12. doi:10.1111/j.1939-165X.2000.tb00389.x.
- [50] L.L. Berger, Trace Minerals : Keys to Immunity, *Salt Inst. Anim. Nutr. Prof.* 28 (1996) 1–4.
- [51] R. J. G. Lester, Joan Budd, Some changes in the blood cells of diseased coho salmon. *Can. J. Zool.* 57 (1979) 1458-1464.
- [52] E. R. Matushima, M. Mariano, Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia), 1 (1996) 5–10.
- [53] M. Esteban, A. Cuesta, E. Chaves-Pozo, J. Meseguer, Phagocytosis in Teleosts Implications of the New Cells Involved. *Biology.* 4 (2015) 907–922. doi:10.3390/biology4040907.
- [54] R. Schreck, K. Albermann, PA. Baeuerle, Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* 17 (1992) 221-37.

- [55] R. B. Baggs, S.A. Miller, Nutritional Iron Deficiency as a Determinant of Host Resistance in the Rat. *J. Nutr.* 103 (1973) 1554–1560. <https://doi.org/10.1093/jn/103.11.1554>.
- [56] N.S. Scrimshaw, J.P. San Giovanni, Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (1997) 464S-477S.
- [57] M.S. Izquierdo, W. Ghrab, J. Roo, K. Hamre, C.M. Hernández-Cruz, G. Bernardini, G. Terova, R. Saleh, Organic, inorganic and nanoparticles of Se, Zn and Mn in early weaning diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*; Linnaeus, 1758), *Aquac. Res.* 48 (2016) 2852–2867. doi:10.1111/are.13119.
- [58] D. Knox, C. B. Cowey, J. W. Adron, The effect of low dietary manganese intake on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr.* 46 (1981) 495-501. <https://doi.org/10.1079/BJN19810058>.
- [59] A. Maage, B. Lygren, A. F. A. El-Mowafic, Manganese requirement of Atlantic salmon. *Fisheries Science.* 66 (2000) 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00001.x>.
- [60] Y.H. Lin, S.M. Lin, S.Y. Shiau, Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, *Aquaculture.* 284 (2008) 207–210. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.07.049.
- [61] J.W. Hilton, P.V.Hodson, S.J. Slinger, The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Nutr.* 110 (1980) 2527-35. doi: 10.1093/jn/110.12.2527.
- [62] A.L. Monteiro, D. A.; Rantin, F. T.; Kalinin, Uso do selênio na dieta de matrinxã, (2007) 32–47.
- [63] D.L.M. Gatlin, R.P. Wilson, Studies on the manganese requirement channel catfish of fingerling, *Science.* 41 (1984) 85–92.
- [64] P. V. Hodson, D. J. Spry, B. R. Blunt, Effects on Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) of a Chronic Exposure to Waterborne Selenium, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37 (1980) 233-240. <https://doi.org/10.1139/f80-030>.

- [65] E.M.B. Sorensen, T.L. Bauer, A correlation between selenium accumulation in sunfish and changes in condition factor and organ weight, *Environ. Pollution. Ser. A, Ecol. Biol.* 34 (1984) 357–366. doi:10.1016/0143-1471(84)90113-2.
- [66] I. Ozardali, M. Bitiren, A.Z. Karakilçik, M. Zerir, N. Aksoy, D. Musa, Effects of selenium on histopathological and enzymatic changes in experimental liver injury of rats, *Exp. Toxicol. Pathol.* 56 (2004) 59–64. doi:10.1016/j.etp.2004.05.001.
- [67] F. Huang, M. Jiang, H. Wen, F. Wu, W. Liu, J. Tian, C. Yang, Dietary zinc requirement of adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed semi-purified diets, and effects on tissue mineral composition and antioxidant responses, *Aquaculture.* 439 (2015) 53–59. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.01.018.
- [68] M.N. Naser, Role of Iron in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Nutrition: Requirement. Bioavailability. Disease Resistance and Immune Response, Ph. D. Thesis. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia (2000) 282.
- [69] S. Lee, R.W. Nambi, S. Won, K. Katya, S.C. Bai, Dietary selenium requirement and toxicity levels in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Aquaculture.* 464 (2016) 153–158. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.06.027.
- [70] G.R. Bell, D.A. Higgs, G.S. Traxler, The effect of dietary ascorbate, zinc, and manganese on the development of experimentally induced bacterial kidney disease in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*), *Aquaculture.* 36 (1984) 293–311. doi:10.1016/0044-8486(84)90323-5.
- [71] D. Zhang, A. Li, Y. Guo, Q. Zhang, X. Chen, X. Gong, Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China, *Aquaculture.* 412–413 (2013) 64–69. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.014.
- [72] L. Tang, K. Huang, J. Xie, D. Yu, L. Sun, Q. Huang, Y. Bi, Dietary copper affects antioxidant and immune activity in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*), *Aquac. Nutr.* 23 (2017) 1003–1015. doi:10.1111/anu.12468.

7. Referências Introdução Geral

AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 2, p. 195–206, 2011.

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

ASHMEAD, H. D. **the role of amino acid chelates in animal nutrition**. [s.l: s.n.], 1992.

AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 67, p. 40–54, 2017.

AZEVEDO, T. M. P. et al. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 1, p. 41–49, 2006.

BARROS, MM., PEZZATO, LE., KLEEMANN, GK., HISANO, H. e ROSA, GJM., Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia.**, vol. 31, no. 6, p. 2149-2156, 2002.

BEISEL, W.R., Single nutrient and immunity. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 35, 417-468, 1982.

BELL, J. G. B. G. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal , selenite , selenomethionine and selenocystine in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). n. October 2016, 1989.

BHASKARAM, P. Immunology of iron deficient subjects. **Chandra, R.K. (Ed.), Nutrition and Immunology**. pp. 149-168 , 1988.

BHUJEL, R. C. A Manual for tilapia business management. CABI, 2014.

BOLTAÑA, S. et al. PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1195–1203, 2011.

BOTELHO, H. A. et al. francisella sp. – uma revisão. **Revista Científica de MEDICINA VETERINÁRIA** - ISSN:1679-7353 Ano XIII-Número 25, 2015.

CHIDEROLI, R. T. et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture Journal**, v. 479, n. May, p. 45–51, 2017.

CHU, C. et al. Genetic and pathogenic difference between *Streptococcus agalactiae* serotype Ia fish and human isolates. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

CLEARWATER, S. J.; FARAG, A. M.; MEYER, J. S. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 132, n. 3, p. 269–313, 2002.

DE ROSA, G., KEEN, C.L., LEACH, R.M., HURLEY, L.S. Regulation of superoxide dismutase activity by dietary manganese. **Journal of Nutrition** 110, 795–804, 1980.

DO CARMO E SÁ, M. V. et al. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles diets. **Aquaculture**, v. 238, n. 1–4, p. 385–401, 2004.

DOTTA, G. et al. Acute inflammation and hematological response in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and Aloe barbadensis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 491–496, 2015.

DUTRA, V. G. et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 323, 2014.

EID, A. E.; GHONIM, S. I. Dietary Zinc Requirement of Fingerling *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 119, n. 2–3, p. 259–264, 1994.

ELDAR, A. et al. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 33–40, 1995.

ELDAR, A., BEJERANO, Y., BERCOVIER, H., 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningo-encephalitis in fish. **Current Microbiology**. 28 (3), 139–143, 1994.

EL-SAYED, A.-F. M. **Tilapia culture**. v. 106. 2006.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Pesca e aquicultura. **Embrapa**, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura>. Acesso em: fevereiro. 2018.

EMERSON, J. et al. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo , (*Oreochromis niloticus*). **Sciences-New York**, n. 4, 2004.

EVANS, J. J. et al. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 9, p. 505–513, 2002.

EVANS, J. J. et al. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: A dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 1369–1376, 2008.

FAO. A world overview of species of interest to fisheries. *Oreochromis niloticus*. FIGIS Species Fact Sheets. Text by SIDP – Species Identification and Data Programme. **In: FAO Fisheries and Aquaculture Department**. 2000-2018 Acesso em: fevereiro. 2018

FAO. Global agriculture towards 2050. High Level Expert Forum-How to feed the world 2050, p. 1–4, 2009.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. p. 23, 2016.

FERNANDO KUBITZA, JOÃO LORENA CAMPOS, E. A. O. E P. I. I **Panorama da Piscicultura no Brasil**. v. 2010, n. Figura 2, p. 1–5, 2012

FIGUEIREDO, H. C. P. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 678–680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 678–680, 2006

FISCHER, U. et al. Cytotoxic activities of fish leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 209–226, 2006.

FORBES, R. M.; ERDMAN, J. W. Bioavailability of trace mineral elements. **Annual Review of Nutrition**, p. 213–231, 1983.

FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, 375 p. 2012.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Advances in Enzymology**. 41 : 35-97, 1974.

GAD, N. S. Oxidative stress and antioxidant enzymes in *Oreochromis niloticus* as biomarkers of exposure to crude oil pollution Nahed S. Gad. **Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 1, p. 49–58, 2011.

GATLIN III, D. M.; WILSON, R. P. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, n. 3, p. 627-33, 1984.

GODOY, D. T. et al. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 476–483, 2013.

GUDDING R et al. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 72: 203-212, 1999.

HALLBERG, L. Bioavailability of dietary iron in man. **Annual Reviews**, 1981.

HAMBIDGE, K.M.; CASEY, C.E.; KREBS, N.F. Zinc. in W. Mertz. Trace elements in human and animal nutrition. p.1-137, 1986.

HILTON, J. W. The Interaction of Vitamins , Minerals and Diet Composition in the Diet of Fish. **Aquaculture**, v. 79, p. 223–244, 1989.

HILTON, J. W.; HUDSON, P. V.; SLINGER, S. J. Possible routes of elimination of dietary. **Journal of Nutrition** ., 109: 965-969, 1979

HOFFMANN, P. R. Mechanisms by which selenium influences immune responses. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v.57 p. 289–297, 2007.

HOLT, J. G. et al. Bergeys's manual of determinative bacteriology. Baltimore: **Williams e Wilkins**, 787 p, 1994.

IBGE. Produção pecuária 2016. Produção Pecuária Municipal, v. 44, p. 1–49, 2016.

IMPERI, M. et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 212–214, 2010.

JENG, S. S.; SUN, L. T. Effects of dietary zinc on zinc concentrations in tissues of common carp. **Journal of Nutrition**, n. November, p. 134–140, 1981.

KALLY, C. et al. Detecção de *Streptococcus* spp. em pisciculturas de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) tilápia do Nilo na região semiárida da Bahia . p. 4–6, 2013.

KETOLA, H.G. Influence of dietary zinc on cattracts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Nutrition**, v. 109, p. 965-969, 1979.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. **Myeloperoxidase: Structure and Function of the Green Heme Peroxidase of Neutrophils**. [s.l: s.n.], 2015.

KIM, J. H. et al. Detection of major bacterial and viral pathogens in trash fish used to feed cultured flounder in Korea. **Aquaculture**, v. 272, n. 1–4, p. 105–110, 2007.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 111–133, 2012.

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

KLESIOUS P, EVANS J, SHOEMAKER C, YEH H, GOODWIN AE, ADAMS A, THOMPSON K Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. **Aquaculture** 258:180–186, 2006.

KLESIOUS, P.H., SHOEMAKER, C.A., & EVANS, J.J. *Streptococcus*: A worldwide fish health problem. **International Symposium on Tilapia in 8th Aquaculture** (pp. 83-107). Cairo. 2008.

KLESIOUS, P.H., SHOEMAKER, C.A., EVANS, J.J. Vaccination: A health management practice for preventing diseases caused by *Streptococcus* in tilapia and other cultured fish. In **K. Fitzsimmons & J. Carvalho Filho (Eds.)**, *Tilapia Aquaculture in the 21st Century*, Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture, pp. 558-564, 2000.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafio. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, p. 10–23, 2015.

- LALL, S. P. Comparative mineral nutrition of fish: sources and requirements. **Nutritional biotechnology in the feed and food industries: Proceedings of Alltech's 23rd Annual Symposium. The new energy crisis: food, feed or fuel?**, p. 387–391, 2007.
- LALL, S. P. Nutrition and health of fish. p. 13–23, 2000.
- LALL, S.P. The minerals. **Fish Nutrition** (Halver, J.E. ed.) pp. 219–257, 1989.
- LALL, S.P., OLIVIER, G., Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish. In: **Fish Nutrition in Practice** (Kaushik, S.J, Luquet, P., Eds.), pp.101-118. INRA, 1993.
- LANGE, S.; MAGNADÓTTIR, B. Spontaneous haemolytic activity of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) serum. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 1, p. 99–106, 2003.
- LANNO, R.P. et al. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. **Aquaculture**. v. 49, p.257-268, 1985.
- LE, K. T.; FOTEDAR, R. Bioavailability of selenium from different dietary sources in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). **Aquaculture**, v. 420–421, p. 57–62, 2014.
- LIM C., WEBSTER C.D. & LEE C.S. Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets. **Haworth Press**, 2008b.
- LIM C., YILDIRIM-AKSOY M.&KLESZIUS P.H. Nutrition and disease resistance in fish. In: **Feeding and Digestive Functions in Fish** (ed. by J.E.P. Cyrino, D.P. Bureau & R.G. Kapoor), pp. 479–545 ,2008a.
- LIM, C.; KLESZIUS, P. H.; DUNCAN, P. L. Immune Response and Resistance of Channel Catfish to *Edwardsiella ictaluri* Challenge when Fed Various Dietary Levels of Zinc Methionine and Zinc Sulfate. **Journal of Aquatic Animal Health**, p. 37–41, 1996.
- LIM, C.; SHOEMAKER, C. A.; KLESZIUS, P. H. The effect of ascorbic acid on the immune response in fish. In: DABROWSKI, K. (Ed.). **Ascorbic Acid in Aquatic Organisms**. Boca Raton: CRC Press, p.149-166, 2001.
- LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Tilapia: biology, culture and nutrition**. New York: Haworth Press, 678 p, 2006.

- LIN, Y. H.; LIN, S. M.; SHIAU, S. Y. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Aquaculture**, v. 284, n. 1–4, p. 207–210, 2008.
- LIN, Y.-H.; SHIAU, S.-Y. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper (*Epinephelus malabaricus*), fed high copper. **Aquaculture**, 267:38–43, 2007.
- LIPING, L.; FITZSIMMONS, K. Better Science, Better Fish, Better Life, **Proceedings of the Ninth International Symposium on Tilapia in Aquaculture**. 2011.
- LIU, G., ZHU, J., CHEN, K., GAO, T., YAO, H., LIU, Y., ZHANG, W., LU, C., Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**. 122, 163–170, 2016.
- LO, M. T.; SANDI, E. **J. Environ. Pathol. Toxicol.** 4, 193, 1980.
- LOVELL, R.T. Feed deprivation increases resistance of channel catfish to bacterial infection. **Aquaculture Magazine** 6: p. 65-67, 1996.
- MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Marine Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 361–379, 2010.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137–151, 2006.
- MANNING, M. J.; JOVANOVIĆ, C. B. **Fish Immunology**. [s.l: s.n.] 1985.
- MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, 108:652-659, 2000.
- MCDOWELL, L.R. Minerals in Animal and Human Nutrition. **Academic Press**. [s.l: s.n.], 1992.
- MERTZ, W. **Trace Elements In Human and Animal Nutrition**. [s.l: s.n.]. v. 20, 1956.
- MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1–2, p. 180–183, 2009.
- MURAI, T. Effects of dietary copper on channel catfish. **Aquaculture**. v. 22, p.353-357, 1981.
- MUTANEN, M. Bioavailability of selenium. **Annals of Clinical Research**, 18, 48–54, 1986.

- NGUYEN, H. T.; KANAI, K.; YOSHIKOSHI, K. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. **Aquaculture**, v. 205, n. 1–2, p. 7–17, 2002.
- NRC. NRC- National Research Council. Nutrient Requirements of fishes and shrimps. National Academic Press, Washington, D.C., 2011.**
- O'DELL, B.L.; BROWNING, J.D.; REEVES, P.G. Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. **Journal of Nutrition**, v.117, p.1883–1889, 1987.
- OBERLEAS, D. Toxicants Occurring Naturally in Foods. **National Research Council**. p. 363, 1973.
- ORTEGA ASENCIOS, Y. et al. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 74–79, 2016.
- PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R. T. Comparative Net Absorption of Chelated and Inorganic Trace Minerals in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Diets. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 28, n. 1, p. 62–67, 1997.
- PAULSEN, C.E., CARROLL, K.S. Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. **Chemical Reviews**. 113, 4633–4679, 2013.
- PLUMB, J. A. et al. *Streptococcus sp.* from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 103, n. 2, p. 358–361, 1974.
- POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia Life History and Biology. **South Regional Aquaculture Center**, n. 283, p. 1–4, 1999.
- POSTON, H. A.; COMBS, JR., G. F.; VITZ, L. L. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. **Journal of Nutrition**, v. 106, p. 892-904, 1976.
- PRADEEP, P. J. et al. Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 58–66, 2016.

QI, W. Social and economic impacts of aquatic animal health problems in aquaculture in China. **FAO Fisheries Technical Paper**, v. 2, n. 406, p. 55–61, 2002.

RABIE, F. et al. Evolution of catalase in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 43, n. 4, p. 1053–1055, 1972.

RAGHIANTE, F. et al. Francisella spp. em tilápias no Brasil: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p. 119–130, p. 119–130, 2017.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 201–221, 2009.

RAMAKRISHNAN, S. et al. Eales' disease: Oxidant stress and weak antioxidant defence. **Indian journal of ophthalmology** v. 57, p. 95–102, 2007.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 881–941, 2000.

ROBINSON, J. A.; MEYER, F. P. Streptococcal fish pathogen. **Journal of bacteriology**, v. 92, n. 2, p. 512, 1966.

RODKHUM, C.; KAYANSAMRUJ, P.; PIRARAT, N. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype ia infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, n. 3, p. 309–314, 2011.

ROTRUCK, J. T. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **SCIENCE**

SALVADOR, R. et al. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: Effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, n. 3, p. 235–241, 2012.

SALVADOR, R. et al. Isolamento de *Streptococcus* spp de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 35–42, 2003.

SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374–1378, 2005.

SANDERSON, S. et al. Mucus entrapment of particles by a suspension-feeding tilapia (Pisces: Cichlidae). **The Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 1743–56, 1996.

SATOH S, TAKEUCHI T, WATANABE T. Availability of manganese and magnesium contained in white fish meal to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Nippon Suisan Gakkaishi** 57: 99–104, 1991.

SATOH S., TABATA K., IZUME K., TAKEUCHI T. & WATANABE T. Effect of dietary tricalcium phosphate on availability of zinc to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Nippon Suisan Gakk** , 1199-1205, 1987.

SATOH, S., POE, W.E., WILSON, R.P. Effect of supplemental phytate and/or tricalcium phosphate on weight gain, feed efficiency and zinc content in vertebrae of channel catfish. **Aquaculture**. 155-161, 1989.

SATOH, S., TABATA, K., IZUME, K., TAKEUCHI, T., WATANABE, T. Effect of dietary tricalcium phosphate on availability of zinc to rainbow trout. **Nippon Suisan Gakkaishi** 53, 1199–1205, 1987.

SBARRA AJ, KARNOVSKY ML: The biochemical basis of phagocytosis I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Biological Chemistry** 234:1355, 1959.

SCOTT, M. L.. Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology. **Wiley (Interscience)**. p. 629, 1973.

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

SECOMBES, C. J.; WANG, T. **The innate and adaptive immune system of fish**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2012.

SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 43–47, 1993.

SHEEHAN, B. Manejo de *Streptococcus* en peces de aguas cálidas. **Intervet Schering - Plough Animal Health**, n. Figura 2, 2010.

SHIAU, S. Y.; NING, Y. C. Estimation of dietary copper requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. **Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 287–292, 2003.

SHIAU, S.-Y.; SU, L.-W. Ferric Citrate is Half as Effective as Ferrous Sulfate in Meeting the Iron Requirement of Juvenile Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 2, p. 483–488, 2003.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; PLUMB, J. A. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 58, n. 2, p. 181–190, 1997.

SIES, H., BERNDT, C., JONES, D.P., 2017. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**. 86, 715–748, 2017.

SUANYUK, N., KONG, F., KO, D., GILBERT, G. L., SUPAMATTAYA, K. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis sp.* and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand — Relationship to human isolates? **Aquaculture**, v. 284, n. 1, p. 35-40, 2008.

SUEBSING, R. et al. Evaluation of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* in tilapia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 317–324, 2013.

SUN, J. et al. Inapparent *Streptococcus agalactiae* infection in adult/commercial tilapia. **Nature**, v. 6, p. 26319, 2016

SUZUKI, Y.; IIDA, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, n. C, p. 149–160, 1992.

SYED, M.A. AND COOMBS, T.L. Copper metabolism in the plaice *Pleuronectes platessa* (L). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 63: 281-286, 1982.

TANIGUCHI, M., Effects of the food quality on the appearance of yellowtail streptococcosis. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, 49: 363-366, 1983.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, n. July, 2017.

THORSTENSEN, K.; ROMSLO, I. The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. **The Biochemical Journal**, v. 271, n. 1, p. 1–9, 1990.

- URIBE, C. et al. Innate and adaptive immunity in teleost fish : a review. **Veterinari Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486–503, 2011.
- WANG, C.; LOVELL, R. T. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 152, n. 1–4, p. 223–234, 1997.
- WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151, n. 1–4, p. 185–207, 1997.
- WEEKS-PERKINS, B. A.; ELLIS, A. E. Chemotactic responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages to virulent and attenuated strains of *Aeromonas salmonicida*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 5, n. 4, p. 313–323, 1995.
- WENDOVER, N. Streptococcus in tilapia: implications for vaccine development and field experiences from Asia. **In Brazil: increased performance and profits Msd Animal Health**, Brazil, 2011.
- WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 6, p. 1127–1151, 2007.
- WISE, D. J., J. R. TOMASSO, T. E. SCHWEDLER, V. S. BLAZER AND D. M. GATLIN III. Effect of vitamin E on the immune response of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, 5: 183-1 88, 1993.
- WORLD BANK. Reducing Disease Risk In Aquaculture. **The World Bank. Agriculture and Environmental Services**, n. 88257, p. 119, 2014.
- XU, D. H.; SHOEMAKER, C. A.; KLESZIUS, P. H. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 30, n. 4, p. 233–238, 2007.
- YANONG, R. P. E.; FRANCIS-FLOYD, R. Streptococcal Infections of Fish. **University of Florida**, p. 1–5, 2002.
- ZAMRI-SAAD, M.; AMAL, M. N. A.; SITI-ZAHRAH, A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2–3, p. 227–229, 2010.

ZHENG, Y. et al. Dietary supplementation with rutin has pro-/anti-inflammatory effects in the liver of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 64, p. 49–55, 2017.