

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**LUIS ALFONSO CASTRO ZAMBRANO**

**PREBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO SOB BAIXA  
TEMPERATURA: DESEMPENHO PRODUTIVO, RESPOSTAS  
FISIOLÓGICAS E MORFOLOGIA INTESTINAL**

**DOIS VIZINHOS**

**2021**

**LUIS ALFONSO CASTRO ZAMBRANO**

**PREBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO SOB BAIXA  
TEMPERATURA: DESEMPENHO PRODUTIVO, RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E  
MORFOLOGIA INTESTINAL**

**PREBIOTICS IN THE FEEDING OF TILAPIA OF NILE IN WINTER: PRODUCTIVE  
PERFORMANCE, PHYSIOLOGICAL RESPONSES, AND INTESTINAL  
MORPHOLOGY**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado

**DOIS VIZINHOS**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho licenciado, mesmo para fins comerciais, desde que atribuam, ao autor, o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Dois Vizinhos



LUIS ALFONSO CASTRO ZAMBRANO

**PREBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA-DO-NILO SOB BAIXA TEMPERATURA:  
DESEMPENHO PRODUTIVO, RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E MORFOLOGIA INTESTINAL.**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Produção Animal.

Data de aprovação: 11 de Junho de 2021

Prof Ricardo Yuji Sado, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Alvaro Jose De Almeida Bicudo, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Prof Jose Eurico Possebon Cyrino, Doutorado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 17/06/2021.

## **AGRADECIMENTOS**

São muitas as instituições e pessoas envolvidas no processo e conclusão deste trabalho. Agradeço ao Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (PAEC), ao Grupo de Cooperação Internacional de Universidades Brasileiras (GCUB), à Organização dos American Estados (OEA), e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), por me permitir fazer estudos de mestrado neste grande país.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado, pelas orientações que recebi dele e por tudo que aprendi sobre a área de imunologia em peixes.

Ao maravilhoso corpo docente da pós-graduação, com o qual adquiri tantos e tão importantes conhecimentos. Aos meus colegas de mestrado e da UNEPE Piscicultura, que se tornaram amigos.

Meus agradecimentos também para minha família, porque a família é o pilar de todo homem, e fundamental para a sociedade. Finalmente, graças a Deus, por me conceder concluir esta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e da Fundação Araucária – protocolo 37896.

## RESUMO

CASTRO, Luis. Prebióticos na alimentação de tilápia do Nilo sob baixa temperatura: desempenho produtivo, respostas fisiológicas e morfologia intestinal. 2021. 54 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2021.

Sistemas intensivos são cada vez mais utilizados em espécies de crescente importância econômica, tal é o caso da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), considerada uma espécie consolidada na aquicultura global e a mais importante na piscicultura brasileira. Na região Sul do país, principalmente, ocorrem alterações fisiológicas nos peixes quando há diminuição na temperatura da água nos meses de inverno, o que pode facilitar a ocorrência de doenças, e uma solução potencial para diminuir os distúrbios fisiológicos no animal é o uso de aditivos prebióticos como  $\beta$ -glucana e mananoligossacarídeos (MOS), que podem reforçar o sistema imune do peixe sob baixa temperatura da água. Em este estudo foram utilizados 180 juvenis de tilápia distribuídos aleatoriamente em 12 viveiros experimentais com temperatura média de  $18,32 \pm 1,83^{\circ}\text{C}$ , compondo um delineamento em inteiramente casualizado com três repetições, para avaliar as dietas: controle, sem suplementação de prebióticos (DC), 0,2% MOS de inclusão (DM), 0,2%  $\beta$ -glucanas de inclusão (DG) e 0,1% MOS + 0,1%  $\beta$ -glucanas de inclusão (DMG). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (10h00m e 17h00m) por 90 dias. O desempenho produtivo, parâmetros hematológicos, imunológicos, e morfologia intestinal foram avaliados. O ganho de peso, índice de conversão alimentar, taxa de crescimento específico e fator de condição não foram influenciados pelas dietas, o consumo da ração foi significativamente inferior com DG ( $P < 0,05$ ) quando comparado com DC. Não houve alterações na hematologia ou na bioquímica sanguínea ( $P > 0,05$ ) devido à inclusão de prebióticos na dieta. O nível de lisozima no soro foi aumentado por DM ( $P < 0,05$ ), no caso da lisozima no muco, foi aumentada pelos tratamentos DM e DG ( $P < 0,05$ ), quando comparados a DC. A maior resposta na atividade respiratória dos leucócitos foi observada em peixes alimentados com DMG ( $P < 0,05$ ). A função fagocitária dos leucócitos e o comprimento da altura das vilosidades intestinais foram maiores ( $P < 0,05$ ) nos peixes que receberam suplementos prebióticos quando comparados com os peixes que receberam DC. A suplementação dietética com 0,2% de MOS e 0,1% de MOS + 0,1% de  $\beta$ -glucanas modulam positivamente a resposta imune não específica e a morfologia intestinal, também, a inclusão de 0,2% de  $\beta$ -glucanas na dieta melhoram a estrutura intestinal da tilápia do Nilo mantida a baixa temperatura da água por 90 dias.

**Palavras-chave:** Estresse por frio; Imunomoduladores; Mananoligossacarídeos;  $\beta$ -glucanas; Intestino.

## ABSTRACT

CASTRO, Luis. Prebiotics in the feeding of tilapia of Nile in winter: productive performance, physiological responses, and intestinal morphology. 2021. 54 p. Dissertation (Masters in Animal Science) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2021.

Intensive systems are increasingly used in species of increasing economic importance, such as the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), considered a consolidate species in global aquaculture and one of the most important in Brazilian fish farming. In the Southern region of the country, mainly, physiological changes occur in fish when there is a decrease in water temperature in the winter months, which can facilitate the occurrence of diseases, and a potential solution to reduce physiological disorders in the animal is the use of prebiotic additives such as  $\beta$ -glucan and mannanoligosaccharides (MOS), which can boost the fish's immune system under low water temperature. In this study, 180 tilapia juveniles were randomly distributed in 12 experimental nurseries with an average temperature of  $18,32 \pm 1,83^{\circ}\text{C}$ , composing a completely randomized design with three replications, to evaluate the diets: control, without prebiotic supplementation (DC), 0.2% MOS inclusion (DM), 0.2% inclusion  $\beta$ -glucans (DG) and 0.1% MOS + 0.1% inclusion  $\beta$ -glucans (DMG). The fish were fed twice a day (10h00m e 17h00m) for 90 days. Productive performance, hematological, immunological, and intestinal morphology parameters were evaluated. Weight gain, feed conversion index, specific growth rate and condition factor were not influenced by diets, feed intake was significantly lower with DG ( $P < 0.05$ ) when compared with DC. There were no changes in hematology or blood biochemistry ( $P > 0.05$ ) due to the inclusion of prebiotics in the diet. The level of lysozyme in serum was increased by DM ( $P < 0.05$ ), in the case of lysozyme in mucus, it was increased by treatments DM and DG ( $P < 0.05$ ), when compared to DC. The greatest response in the respiratory activity of leukocytes was observed in fish fed with DMG ( $P < 0.05$ ). The phagocytic function of the leukocytes and the length of the height of the intestinal villi were higher ( $P < 0.05$ ) in fish that received prebiotic supplements when compared to fish that received DC. Dietary supplementation with 0.2% MOS and 0.1% MOS + 0.1%  $\beta$ -glucans positively modulates the non-specific immune response and intestinal morphology, as well as the inclusion of 0.2%  $\beta$ - Dietary glucans improve the intestinal structure of Nile tilapia kept at low water temperature for 90 days.

**Keywords:** Cold stress; Immunostimulants; Mannanoligosaccharides;  $\beta$ -glucans; Intestine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 – Morfologia externa da tilápia do Nilo. ....	14
Figura 1 - Produção de tilápia por país e clima associado. ....	15
Figura 2 – Altura das vilosidades intestinais de tilápias do Nilo ( <i>O. niloticus</i> ) suplementadas com prebióticos por 90 dias. ....	34
Figura 3 – Níveis de lisozima sérica (A) e lisozima no muco (B) de tilápia do Nilo ( <i>O. niloticus</i> ) suplementadas com prebióticos por 90 dias. ....	36
Figura 4 – Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) de juvenis de tilápia do Nilo ( <i>O. niloticus</i> ) suplementadas com prebióticos por 90 dias. ....	37
Figura 5 – Atividade fagocítica (A) e índice fagocítico (B) dos leucócitos nas tilápia do Nilo ( <i>O. niloticus</i> ) suplementadas com prebióticos por 90 dias. ....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulação, composição aproximada e estimada das dietas. ....	25
Tabela 2 – Média e desvio padrão dos parâmetros de desempenho de tilápia do Nilo ( <i>O. niloticus</i> ) suplementado com prebióticos por 90 dias. ....	33
Tabela 3 – Média e desvio padrão do eritrograma, leucograma, trombograma e parâmetros bioquímicos da tilápia do Nilo ( <i>O. niloticus</i> ) suplementada com prebióticos por 90 dias. ....	35



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos da produção e biologia da tilápia do nilo</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Aspectos gerais em hematologia de peixes</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Sistema imunológico em peixes</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Prebióticos na alimentação de peixes</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Arranjo experimental</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Dietas experimentais</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>Avaliação dos parâmetros de desempenho</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4</b>	<b>Morfologia intestinal</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5</b>	<b>Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímica sanguínea</b> .....	<b>27</b>
3.5.1	Contagem de eritrócitos .....	27
3.5.2	Porcentagem de hematócrito .....	27
3.5.3	Concentração de hemoglobina.....	28
3.5.4	Variáveis hematimétricas .....	28
3.5.5	Contagem total de leucócitos e trombócitos.....	28
3.5.6	Contagem diferencial de leucócitos.....	29
3.5.7	Concentração de proteína plasmática total .....	29
3.5.8	Concentração de glicose .....	29
<b>3.6</b>	<b>Avaliação dos parâmetros imunológicos</b> .....	<b>30</b>
3.6.1	Atividade respiratória dos leucócitos .....	30
3.6.2	Concentração de lisozima sérica e no muco .....	30
3.6.3	Função fagocítica dos leucócitos .....	31
<b>3.7</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Parâmetros de desempenho</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>Morfologia intestinal</b> .....	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Parâmetros hematológicos e bioquímicos</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4</b>	<b>Parâmetros imunológicos</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção da aquicultura mundial continua em expansão, e sua importância no fornecimento de proteína de origem animal frente ao constante aumento da população, reside na dificuldade de crescimento do setor pesqueiro. Em 2018, a piscicultura continental produziu 86,5% do pescado destinado ao consumo global, e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) contribuiu enormemente para essa conquista, sendo a terceira espécie mais cultivada no mundo com mais de 4,18 milhões de toneladas (FAO, 2020), devido a espécie apresentar alta produtividade e fácil comercialização (SIDDIK et al., 2014; ELGENDY et al., 2015). A demanda por esta espécie de tilápia continua a aumentar no mercado brasileiro (VALLADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2018; PEIXE-BR, 2020), sendo o principal peixe criado, representando 57% da piscicultura nacional e espera-se um aumento do volume de produção (PEIXE-BR, 2020).

O crescimento na produção da tilápia do Nilo deve-se à sua tolerância a diferentes ambientes climáticos que permite seu desenvolvimento em regiões subtropicais e temperadas (MAGOUZ et al., 2019; NOBREGA et al., 2020), e à adaptabilidade a sistemas intensivos de produção (HE et al., 2017; AMPHAN et al., 2019). No entanto, o estresse associado à alta densidade de cultivo altera a homeostase dos peixes, diminuindo a resposta imune (MAGNADÓTTIR, 2006; URIBE et al., 2011), facilitando a manifestação de doenças nos peixes mantidos em sistemas intensivos (KIRON, 2012; SADO et al., 2014; SOARES et al., 2018; DAWOOD et al., 2020a). Os problemas antes descritos ocorrem com maior frequência quando a temperatura da água permanece abaixo do limite ideal para tilápia do Nilo.

Quedas na temperatura da água são registradas anualmente durante o inverno no subtópico. No Brasil, o inverno compreende os meses de junho, julho e agosto, nesta estação a temperatura média histórica oscila entre 11,3°C e 20,5°C nas Regiões Sul e Sudeste (CPTE, 2019), onde geograficamente se concentra a maior produção de tilápia do Nilo (PEIXE-BR, 2020). Sob estas condições, temperaturas de água de 20°C a 22°C foram descritas em criações de tilápia do Nilo no estado de São Paulo e sul de Minas Gerais (LIMA DE ALMEIDA et al., 2019), e com menos de 18°C na Região Sul (ARAUJO et al., 2011), alcançando médias mínimas de 16°C (MILSTEIN et al., 2000).

A temperatura da água é um dos fatores mais influentes que afetam o crescimento e a função imunológica dos peixes (HE *et al.*, 2017), devido à natureza ectotérmica desses animais. Temperaturas abaixo do ideal podem ter um impacto negativo em vários processos fisiológicos, reduzindo o metabolismo dos peixes (XU; ZHENG; DING, 2017; WU *et al.*, 2019; NOBREGA *et al.*, 2020). A tilápia do Nilo atinge seu melhor crescimento entre 25 a 28°C (HASSAN *et al.*, 2013; CORRÊA *et al.*, 2018), no entanto, em peixes mantidos a temperatura sub-ótimas de 22°C ocorre redução de 30-40% no consumo do alimento (MA *et al.*, 2015), e diminuição na digestibilidade da proteína e lipídios em cerca de 20% (NOBREGA *et al.*, 2020), quando comparados aos peixes mantidos a uma temperatura ótima, o que leva a uma diminuição no crescimento (HASSAN *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2020), deixando-se de alimentar a temperatura de 16°C (ABDEL-GHANY *et al.*, 2019; EL-SAYED, 2020).

Além de desacelerar a taxa metabólica e o crescimento, baixas temperaturas prejudicam a imunidade e a saúde dos peixes (ABRAM; DIXON; KATZENBACK, 2017; VELMURUGAN; CHAN; WENG, 2019), interferindo no mantimento da homeostase devido aos limitados recursos energéticos para o bom funcionamento do organismo. A tilápia do Nilo é vulnerável à doenças após a imunossupressão causada por fatores estressantes, como a baixa temperatura (FONSECA *et al.*, 2020), e consequentemente, taxas crescentes de mortalidade são registradas durante exposição prolongada a temperaturas inferiores a 15°C (ABDEL-GHANY *et al.*, 2019), com cessação de funções vitais entre 12-10°C (FONSECA *et al.*, 2020; NOBREGA *et al.*, 2020). Para manter a boa saúde e o desempenho satisfatório dos peixes em condições de baixa temperatura, medidas nutricionais adequadas podem ser adotadas, uma vez que o controle da temperatura em sistemas abertos é difícil e custoso.

Neste contexto, é importante a adoção de técnicas e métodos (e.g. aditivos alimentares) que venham a aumentar a resistência do peixe às doenças e sua capacidade de resposta as situações estressantes, por meio da modulação de seu sistema imune (RINGØ *et al.*, 2010; DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2018) e aumento no aproveitamento dos nutrientes da dieta. Atualmente, é necessário adotar as Boas Práticas de Manejo (BPMs) (BOYD *et al.*, 2005) em sistemas de produção de organismos aquáticos, um dos quais consiste em redução ou não uso de

antimicrobianos durante o ciclo de produção em favor do uso de substâncias capazes de modular o sistema imune dos peixes.

Uma das soluções para melhorar a saúde animal é o uso de prebióticos, os quais apresentam estabilidade durante o preparo da dieta garantindo sua funcionalidade no trato gastrointestinal (DAWOOD *et al.*, 2020b). Em peixes, foi relatado o efeito positivo de alguns prebióticos como oligossacarídeos e polissacarídeos sobre o crescimento, eficiência alimentar, imunidade e resistência a doenças (RINGØ *et al.*, 2014; HOSEINIFAR *et al.*, 2015; ABU-ELALA *et al.*, 2018), inclusive, em peixes submetidos a baixas temperaturas (THOMPSON *et al.*, 2015).

Prebióticos são carboidratos de cadeia curta não digeríveis, entre eles, os oligossacarídeos como frutoligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), xilooligossacarídeos (XOS) e mananoligossacarídeos (MOS), e são utilizados em animais aquáticos no intuito de melhorar a saúde animal por meio da modulação da microbiota e morfologia do trato gastrointestinal (NAWAZ *et al.*, 2018). Polissacarídeos como as glucanas, também têm sido amplamente usados na alimentação de animais aquáticos como imunomoduladores (DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2018).

A tecnologia para a produção de tilápia do Nilo no subtópico avançou nos últimos anos, embora existam áreas-chave que necessitam mais investigação, como o uso estratégico de aditivos alimentares em períodos em que o peixe será desafiado com condições ambientais sub-ótimas para seu desenvolvimento, como as baixas temperaturas no período de inverno na Regiões Sul e Sudeste do Brasil. A suplementação com prebióticos em cultivos de peixes mantidos em condições de hipotermia melhorou a resposta imune (THOMPSON *et al.*, 2015) e diminuiu o impacto negativo da baixa temperatura da água sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos (BARROS *et al.*, 2014). No entanto, não existem dados que apontem para o uso do MOS em associação com  $\beta$ -glucanas e seus efeitos imunomoduladores e benéficos em nível intestinal em peixes expostos a longos períodos de estresse por temperatura sub-ótima da água.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de prebióticos (MOS e  $\beta$ -glucanas) e sua associação, sobre o desempenho produtivo, fisiologia e morfologia intestinal de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantidos sob baixa temperatura.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos da produção e biologia da tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é qualificada como a terceira espécie de peixe cultivada em todo o mundo devido à sua capacidade de se adaptar a diferentes fatores ambientais estressantes (DAWOOD *et al.*, 2020b), crescimento rápido com curto intervalo geracional e aceitação de alimentos industrializados após a absorção do saco vitelínico (EL-SAYED, 2020), além disso, contribui com mais de 70% da carne em relação com as outras espécies de tilápia produzida em todo o mundo (MCANDREW *et al.*, 2016; FAO, 2020). Em condições ideais de cultivo intensivo, espécimes de *O. niloticus* são mantidos em tanques com reposição parcial de água a densidades de 13,3 peixes m<sup>-2</sup> durante 360 dias até a colheita, que atinge até 11 t ha<sup>-1</sup> com um fator de conversão alimentar de 1,4 (EL-SAYED, 2020)

A tilápia do Nilo pertence à família *Cichlidae*, dentro da ordem *Perciformes*, e gênero *Oreochromis*, que se caracteriza por ser incubadoras bucais (EL-SAYED, 2020), em geral, as tilápias têm formas corporais profundas e comprimidas lateralmente (Figura 1).

Fotografia 1 – Morfologia externa da tilápia do Nilo.

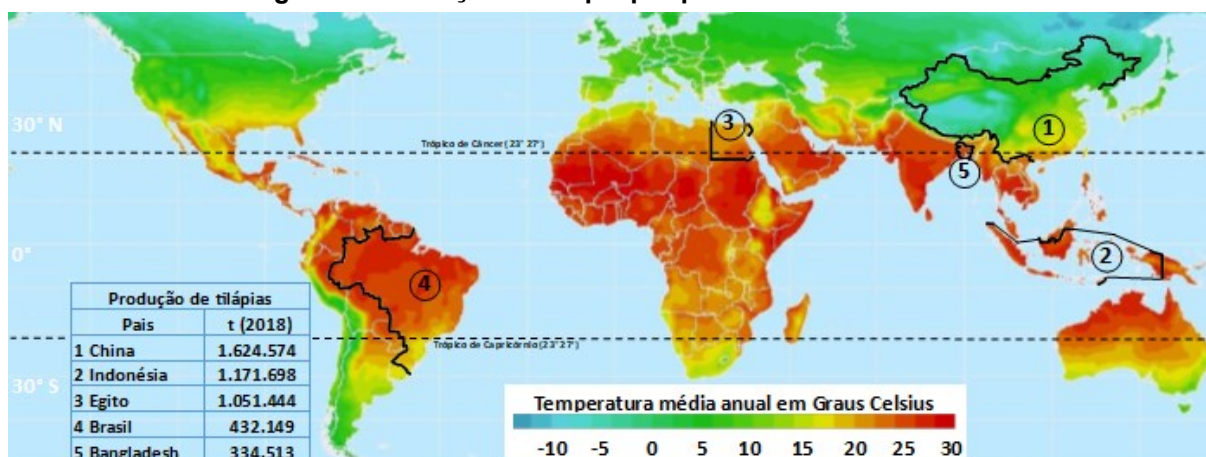


Fonte: Autoria própria (2021). Barra = 2 cm. Autoria própria.

Até 2018, um total de 77 países praticaram o cultivo de tilápia do Nilo (FAO, 2021), sendo cultivada em várias regiões subtropicais do mundo, incluindo Sul do Brasil, Norte de Bangladesh, China e Egito (Figura 2), onde a produção é dificultada durante os meses mais frios do ano. A espécie é afetada por temperaturas abaixo de 22°C, que diminuem as funções fisiológicas, causando inibição do crescimento, e

maior susceptibilidade a doenças devido a alterações em seu sistema imunológico (HE *et al.*, 2017; NOBREGA *et al.*, 2020).

**Figura 1 - Produção de tilápia por país e clima associado.**



Fonte: FAO (2021); The Nelson Institute Center for Sustainability and the Global Environment (2021).

## 2.2 Aspectos gerais em hematologia de peixes

Os parâmetros hematológicos podem ser usados para identificar alterações fisiológicas. Uma vez que os valores de referência para o hemograma são estabelecidos sob padronização condições (FAGGIO *et al.*, 2013), teores específicos do sangue podem fornecer indicadores para monitorar o grau de sanidade dos peixes, e obter informações para o diagnóstico e prognóstico de doenças (BURGOS-ACEVES; LIONETTI; FAGGIO, 2019), e respostas aos desafios estressantes causados pelo meio ambiente e patógenos (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013; STECKERT *et al.*, 2019). Os parâmetros sanguíneos são influenciados por fatores extrínsecos como a temperatura, que afeta os valores quantitativos obtidos (BURGOS-ACEVES; LIONETTI; FAGGIO, 2019).

A temperatura é um dos principais fatores ambientais relacionados a mudanças fisiológicas e bioquímicas em animais ectotérmicos (BURGOS-ACEVES; LIONETTI; FAGGIO, 2019), também influenciando os processos hematológicos (DONALDSON *et al.*, 2008), portanto, a resposta dos peixes às mudanças de temperatura pode ser avaliada usando parâmetros hematológicos. A eritropoiese pode ser afetada pela temperatura (ŘEHULKA; ADAMEC, 2004). Em *Oncorhynchus*

*mykiss*, os parâmetros hematológicos de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e eritrócitos totais (Er) são ligeiramente superiores na estação fria (BURGOS-ACEVES; LIONETTI; FAGGIO, 2019), não obstante, espécies como o robalo da Europa (*Dicentrarchus labrax*) apresentaram aumento nos valores de Et e Ht durante a estação de águas frias, o que pode estar associado ao descarte da concentração de oxigênio dissolvido na água (PASCOLI *et al.*, 2011).

Flutuações significativas no hemograma também foram relatadas em tilápias do Nilo mantidas em um lago que passa por dois períodos sazonais: as estações chuvosa e seca, com menores níveis de Hb, Er e leucócitos totais na estação chuvosa, onde a menor temperatura da água se manifesta no período das chuvas, o que pode ser devido ao alto volume e a menor temperatura da água durante este período (KEFAS; ABUBAKAR; JA'AFARU, 2015). Contrariamente, os parâmetros Ht, Hb e Er não apresentaram diferenças entre três grupos de tilápia do Nilo, mantidas sob temperaturas de 20, 25 e 30°C (JEONG; KIM; KANG, 2012).

O leucócrito de peixes salmonídeos foi descrito como maior em ambientes com temperatura da água mais fria (ALCORN; MURRAY; PASCHO, 2002), pelo contrário, em ciprinídeos, a população de leucócitos diminuiu durante o período frio, como foi verificado em carpa comum (*Cyprinus carpio*) por Engelsma *et al.* (2003). O bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) também apresentou diminuição de leucócitos na estação de menor temperatura da água (MARTINS *et al.*, 2011). O número de leucócitos totais em *Oncorhynchus mykiss* e *Sparus aurata* é afetado por negativamente por baixas temperaturas (GRANT, 2015).

Independentemente de que a temperatura influencie os processos hematológicos, fatores como fotoperíodo, salinidade, estágio de desenvolvimento e tamanho do corpo podem representar desafios ao interpretar esses parâmetros após uma diminuição acentuada na temperatura (BAN, 2000). Algumas respostas hematológicas ao estresse pelo frio são altamente variáveis e podem não ser indicadores sensíveis de estresse hipotérmico (DONALDSON *et al.*, 2008).

### **2.3 Sistema imunológico em peixes**

O sistema imune é um conjunto de componentes humorais e celulares que defendem o organismo contra elementos estranhos, incluindo microrganismos e

macromoléculas, e em peixes a resposta imune é dividida em inata (não específica) e adaptativa (memória) (WANG *et al.*, 2017). O sistema imune não específico inclui a imunidade celular (células fagocíticas, neutrófilos, linfócitos e *natural killer*), imunidade humoral (lisozima, imunoglobulinas, moléculas do sistema complemento, proteínas de fase aguda, peptídeos antimicrobianos e citocinas) e superfícies mucosas (pele, brânquias e mucosa intestinal) que são as principais barreiras físicas imunológicas (HOSEINIFAR *et al.*, 2015; KOSHIO, 2016; WANG *et al.*, 2017). Quando as barreiras físicas falham, os distúrbios são reconhecidos pela imunidade humoral e celular. A resposta imune celular dos peixes é dada graças a tecidos como rim, timo, baço e tecido linfóide associado ao intestino (CHETTRI *et al.*, 2011).

A proteção baseada na imunidade inata é geral por natureza e opera rapidamente, sendo relativamente independente da temperatura (MAGNADÓTTIR, 2006; VAN MUISWINKEL; VERVOORN-VAN DER WAL, 2006). Porém, a expressão da resposta imune específica é afetada por baixas temperaturas, portanto, para os peixes sobreviverem em águas temperadas, funções não específicas devem funcionar independentemente das mudanças na temperatura ambiente (VAN MUISWINKEL; VERVOORN-VAN DER WAL, 2006). A fagocitose em peixes é resistente a baixas temperaturas (KORTET; VAINIKKA, 2008). As células fagocíticas do bagre asiático *Clarias batrachus* exibiram maior taxa de mobilidade, índice fagocitário e atividade microbicida durante o inverno a uma temperatura inferior de 19°C durante inverno do que em temperaturas mais altas de 28 a 31°C (KUMARI *et al.*, 2006). No geral, esses resultados apoiam a ideia de regulação positiva do inverno das defesas imunológicas celulares em peixes, embora o termo inverno signifique ambientes muito diferentes em latitudes diferentes. (VAN MUISWINKEL; VERVOORN-VAN DER WAL, 2006).

Dentre os componentes inatos humorais estão os fatores inibidores do crescimento bacteriano, como a transferrina, antiproteases, proteína C reativa, peptídeos antibacterianos, proteínas do sistema complemento e lisozima (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014).

A lisozima é uma molécula de defesa importante na mediação da proteção contra a invasão microbiana. É uma enzima produzida principalmente por monócitos e neutrófilos (URIBE *et al.*, 2011), sendo encontrada no muco, sangue e outros tecidos, e é ativada por vias alternativas e da lectina (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). A lisozima também promove a fagocitose pela ativação direta de leucócitos ou indiretamente por um efeito opsonínico. A enzima também ataca



estruturas contendo ácido murâmico, hidrolisa glicol e quitina, e tem efeito degradante restrito sobre a quitina (um polímero linear de N-acetilglucosamina), que é o principal componente das paredes celulares de fungos e do exoesqueleto de certos invertebrados (SAURABH; SAHOO, 2008).

A temperatura também afeta a atividade enzimática da lisozima. No salmão (*Oncorhynchus nerka*), a atividade da lisozima foi geralmente mais alta a 12°C do que a 8°C, independentemente da estação (ALCORN; MURRAY; PASCHO, 2002). No *Clarias batrachus*, os níveis de lisozima permaneceram baixos durante o verão em comparação com outras estações (KUMARI *et al.*, 2006). A imunidade humoral inata dos peixes não parece seguir nenhuma tendência sazonal geral em todos os taxa, mas as respostas diferem (entre diferentes grupos), por exemplo, entre ciprinídeos e gadoides (KORTET; VAINIKKA, 2008).

Os componentes humorais inatos como lisozima, proteínas, lectinas, componentes celulares e parâmetros hematológicos (FAZIO, 2019), são utilizados como indicadores da condição física e do surto de doenças de peixes, assim como para análise de eficiência do uso de imunomoduladores, principalmente aqueles de fontes naturais, como os prebióticos.

## **2.4 Prebióticos na alimentação de peixes**

Os prebióticos são constituintes de alimentos considerados não digestíveis, e definidos como ingredientes alimentares fermentados seletivamente pelos microrganismos no intestino, aumentando a liberação de metabólitos bacterianos o que modula a composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios de saúde e bem estar ao peixe, enquanto inibe o crescimento de bactérias patogênicas (BINDELS *et al.*, 2015; MONTALBAN-ARQUES *et al.*, 2015). Microrganismos como *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* e *Bacteroides* são os principais fermentadores dos prebióticos (DE KIVIT *et al.*, 2014; DAS; MONDAL; HAQUE, 2017). Diversos compostos como polissacarídeos (inulina, quitosanas, glucanas) e oligossacarídeos (oligofructose, FOS, XOS, GOS, ou MOS) são utilizados como imunomoduladores na aquicultura (SONG *et al.*, 2014; AKHTER *et al.*, 2015; DAWOOD; KOSHIO, 2016; DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2018). Dentre eles,

destacam o MOS e  $\beta$ -glucanas como principais prebióticos utilizados para modular a imunidade inata, promover o crescimento e melhorar a saúde intestinal do hospedeiro.

Os imunomoduladores são definidos como compostos que modulam o sistema imunológico, aumentando a resistência do hospedeiro contra doenças que, na maioria das circunstâncias, são causadas por patógenos. Após administração oral como suplementos dietéticos, foram confirmados efeitos benéficos de diferentes imunomoduladores sobre o desempenho produtivo (PILARSKI *et al.*, 2017; NÁJERA-ARZOLA *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2018), saúde intestinal (CECHIM *et al.*, 2015; BOWYER *et al.*, 2020), imunidade humoral e celular (VIEIRA DE AZEVEDO *et al.*, 2016; SANCHEZ *et al.*, 2017; DAWOOD *et al.*, 2020b), hematologia e bioquímica sanguínea (LEE *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2018; DAWOOD *et al.*, 2020a), expressão gênica (DAWOOD *et al.*, 2020b; MOUSTAFA *et al.*, 2020), resistência a doenças (ABU-ELALA *et al.*, 2018; AMPHAN *et al.*, 2019; MOUSTAFA *et al.*, 2020) e resistência a toxicidade aos organofosforados (DAWOOD *et al.*, 2020b; DAWOOD *et al.*, 2020a; DAWOOD *et al.*, 2020c). Os imunomoduladores incluem diversas substâncias, como nucleotídeos, vitaminas, ácidos graxos, extratos de plantas, produtos bacterianos, leveduras e prebióticos (KIRON, 2012; HOSEINIFAR *et al.*, 2015).

O MOS é um oligossacarídeo caracterizado como um complexo carboidrato derivado de proteínas glucomananas encontrado na seção externa da parede das leveduras, correspondendo a aproximadamente 40% dessa estrutura celular (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014), sendo que a maioria dos produtos MOS testados no setor da aquicultura derivam da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (TORRECILLAS; MONTERO; IZQUIERDO, 2014). Os mananoligossacarídeos também são uma fonte de manose com alta afinidade por bactérias gram-negativas, uma vez que as bactérias se conectam ao complexo MOS, previnem a colonização do trato gastrointestinal e diminuem surtos de doenças e os efeitos das toxinas, resultando em intestino intacto com boa capacidade de absorção de nutrientes e modulação da imunidade intestinal (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). Paralelamente, microorganismos contendo manose induzem cascatas de sinalização intracelular, mediadas por receptores de manose presentes nos macrófagos, neutrófilos e em células dendríticas, que podem aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias (SONG *et al.*, 2014). Também foi indicado que o tecido linfoide associado ao intestino de peixes alimentados com MOS, têm elevada produção de muco, aumentando as atividades bactericidas e de lisozima (TORRECILLAS; MONTERO; IZQUIERDO, 2014; HOSEINIFAR *et al.*, 2015).

A adição de 0,1% a 0,15% de MOS à dieta promoveu melhoras no desempenho produtivo e resistência a *Aeromonas hydrophila* em carpa comum (EBRAHIMI *et al.*, 2012), também melhorou a saúde intestinal e taxa de crescimento específico do robalo europeu quando adicionado ao 1,6% na dieta (TORRECILLAS *et al.*, 2015a). O uso de 0,1% MOS em rações para bagre do canal resultou na melhora da resposta imune ao nível da mucosa intestinal dos peixes quando desafiados com *Flavobacterium columnare* (ZHAO *et al.*, 2015).

A suplementação alimentar com MOS (0,06% e 0,08%) por 60 dias, apresentou efeitos positivos nos parâmetros hematológicos (Ht, VCM, eritrócitos, leucócitos, linfócitos e monócitos) e imunológicos (lisozima e *burst* oxidativo) quando comparado com a dieta controle, indicando um efeito benéfico na saúde dos peixes, no entanto, após um desafio bacteriano com lipopolissacarídeos não houve diferença entre as dietas testadas a respeito dos parâmetros antes descritos (HA *et al.*, 2017).

Outros resultados obtidos em tilápias do Nilo submetidas ao tratamento com MOS (0,1% e 0,2%) durante 15 semanas, revelaram melhorias significativas no crescimento (ganho de peso, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e sobrevivência) e nos parâmetros bioquímico-hematológicos (eritrócitos e proteínas totais) e imunológicos (atividade fagocitária, *burst* oxidativo e lisozima sérica) (MAGOUZ *et al.*, 2019). Tilápias do Nilo tratadas com 0,8% e 1,5% de MOS por 5 semanas mostraram melhoras no número de bactérias intestinais, bem como um aumento nos parâmetros hematológicos (contagem de monócitos, linfócitos e leucócitos totais) e parâmetros imunológicos (lisozima sérica) quando comparadas com o tratamento controle (LEVY-PEREIRA *et al.*, 2018). Em um estudo com juvenis do *Oreochromis niloticus*, foi demonstrado que diferentes níveis de inclusão de MOS (0, 2, 4, 6, 8 e 10 g kg<sup>-1</sup>) não afetaram significativamente os parâmetros hematológicos, no entanto, o consumo alimentar diminuiu quando os níveis de MOS aumentaram (SADO; BICUDO; CYRINO, 2008).

As  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos de monômeros de D-glicose unidos por ligações  $\beta$ -glicosídicas, em  $\beta$ -glucana de origem microbiano as ligações  $\beta$ -glicosídicas  $\beta$ -1,3 formam uma estrutura longa, com cadeias laterais que surgem por meio de ligações beta  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,6 o qual, torna-se em uma configuração com efeitos de modulação imunológica mais eficazes (LAM; CHI-KEUNG CHEUNG, 2013). Este prebiótico ativa as células do sistema imunológico, ligando-se a seus receptores específicos expressos na superfície dos macrófagos (SONG *et al.*, 2014). A fonte mais

abundante de  $\beta$ -glucanas naturais com propriedades altamente imunomoduladoras são fungos e leveduras (DAWOOD; KOSHIO, 2016). Efeitos positivos da administração oral de  $\beta$ -glucanas sobre respostas imunológicas e resistência a doenças foram descritos em diferentes espécies de peixes, como carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) (LIN *et al.*, 2011), bagre do canal (SANCHEZ *et al.*, 2017) e douradas (*Pagrus major*) (DAWOOD *et al.*, 2017).

Em tilápias do Nilo, o efeito da suplementação alimentar com  $\beta$ -glucanas foi amplamente documentado. O uso de dois níveis (0,1% e 0,2%) de  $\beta$ -glucanas como suplemento alimentar administrado durante 21 dias modulou positivamente respostas inflamatórias, de estresse e genes relacionados ao sistema imunológico após desafio bacteriano com *Streptococcus iniae*, quando comparados com tratamento controle (SALAH; EL NAHAS; MAHMOUD, 2017). A suplementação de tilápias do Nilo com 0,1% de  $\beta$ -glucanas por 6 semanas melhorou o ganho de peso e a eficiência alimentar do que aquelas alimentadas com a dieta controle, e a alimentação com  $\beta$ -glucanas por 4 semanas seguidas de mais 2 semanas de dieta basal aumentou significativamente a produção de EROs pelos leucócitos polimorfonucleares em comparação com peixes alimentados com a dieta de controle. Após 6 semanas de suplementação, os peixes foram desafiados com *S. iniae*, porém, sem diferenças na sobrevivência à infecção entre tratamentos (WELKER *et al.*, 2012).

O uso de  $\beta$ -glucanas suplementada a 0,01%; 0,1% e 1% ou 0,01% e 0,1% por 14 ou 28 dias, respectivamente, em dietas para juvenis de tilápia do Nilo não foram significativamente diferentes da dieta controle a respeito do ganho de peso, proteína total, lisozima sérica, complemento (CH<sub>50</sub>) ou mortalidade, frente ao desafio com *S. iniae*, mas o tratamento com 0,1% de  $\beta$ -glucanas por 14 dias, reduziu o consumo de ração quando comparado com o controle (SHELBY *et al.*, 2009). Ademais, diferentes formas de  $\beta$ -glucana podem exibir comportamentos favoráveis e biologicamente diferenciados na tilápia do Nilo, promovendo o sistema imune ou melhorando índices de desempenho (PILARSKI *et al.*, 2017).

A ação conjunta do MOS e das  $\beta$ -glucanas na alimentação da tilápia do Nilo cultivada sob diferentes condições de estresse foi avaliada nos últimos anos, concluindo que sua associação tem a capacidade de melhorar o desempenho produtivo, a imunidade inata e a sobrevivência após infecções microbianas por *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus graviae*, *Aeromonas hydrophila* ou *S. iniae* (SELIM; REDA, 2015; ABU-ELALA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019), além de melhorar a

expressão de genes relacionados ao sistema imunológico (ABU-ELALA *et al.*, 2018), e a saúde intestinal (aumento da altura das vilosidades e número de linfócitos intraepiteliais) (SELIM; REDA, 2015; CHEN *et al.*, 2019). No entanto, o uso de MOS em associação com  $\beta$ -glucanas até o nível de inclusão de 0,2% por 60 dias, não melhorou o desempenho produtivo de tilápias de Nilo mantidas em condições de temperatura abaixo do ideal ( $22,1 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ) (GARCIA; SANTOS; MORAES, 2011).

O uso de prebióticos para reduzir os efeitos adversos das baixas temperaturas na piscicultura tem sido pouco estudado. Num estudo com juvenis de bagre do canal mantidos a  $15^{\circ}\text{C}$  de temperatura por 12 semanas e alimentados com 0% e 2% de prebióticos (levedura parcialmente autolisada e carboidratos de produtos lácteos) na dieta, foi constatado que o ganho de peso, o consumo de ração, a atividade de lisozima e MCHC foram melhorados significativamente pela adição prebiótica ao 2% (THOMPSON *et al.*, 2015).

O estresse em tilápia do Nilo sob baixa temperatura por curtos períodos de tempo foi estudado, após a suplementação com uma dieta teste (AP: 0,1% de  $\beta$ -glucanas e 0,6% de Vitamina C) e o controle durante 45 dias, para determinar o melhor período de administração (7 dias AP + 38 dias controle, 15 dias AP + 30 dias controle, 30 dias AP + 15 dias controle e 45 dias AP) das dietas. Os peixes mantidos a temperatura de  $23^{\circ}\text{C}$  durante o período de alimentação, foram submetidos a redução gradual na temperatura da água até os  $14^{\circ}\text{C}$  e mantida por 4 dias, concluindo que as respostas hematológicas e bioquímicas dos peixes melhoraram com pelo menos 15 dias alimentação com a dieta teste (BARROS *et al.*, 2014). O uso de misturas prebióticas como o MOS com  $\beta$ -glucanas têm potencial para aumentar o desempenho da tilápia do Nilo em baixa temperatura.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Arranjo experimental

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) de Piscicultura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos. Juvenis de tilápia do Nilo foram adquiridos em uma piscicultura comercial, e transportados para o local de experimentação em sacos plásticos oxigenados. Os peixes foram mantidos por 90 dias num tanque de alvenaria com entrada de água de fluxo contínuo e alimentados duas vezes ao dia (9h00m e 17h00m), com alimento industrializado, posteriormente, e uma semana antes de iniciar o experimento, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (10h00m e 17h00m), com dieta controle até saciedade aparente. Após o período de aclimação de sete dias, os peixes foram sedados com benzocaína ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), pesados individualmente ( $33,21 \pm 0,10 \text{ g}$ ) e alocados aleatoriamente em 12 hapas com volume de  $0,6 \text{ m}^3$  (15 peixes por hapa), estas últimas, distribuídas em três tanques de alvenaria de  $22,5 \text{ m}^3$  utilizados para este estudo.

Cada tanque foi equipado com um sistema de entrada de água de fluxo contínuo durante todo o experimento, cada tanque com válvula de controle individual, permitindo uma troca diária de água de aproximadamente 38%. O pH da água (mPA-210, LUCADEMA, São José do Rio Preto, SP, Brasil), e oxigênio dissolvido (OD) (HI 98193, HANNA Instruments, São Paulo, SP, Brazil) foram monitorados diariamente, resultando em  $7,75 \pm 0,496,42 \pm 0,67 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, a amônia total foi observada semanalmente com kit colorimétrico Labcon (Alcon<sup>®</sup>, Camboriú, SC, Brasil), com concentração de  $0,006 \pm 0,005 \text{ ppm}$ , todos esses parâmetros em uma faixa aceitável para a espécie (EL-SAYED, 2020a). A temperatura da água foi registrada em  $18,32 \pm 1,83^\circ\text{C}$  durante os noventa dias do experimento.

O alimento foi oferecido duas vezes ao dia (10h00m e 17h00m), até a saciedade aparente por 90 dias com as seguintes dietas: DC (dieta controle, sem suplementação de prebióticos), DM (inclusão de 0,2% de MOS), DG (inclusão de 0,2% de  $\beta$ -glucanas) e DMG (inclusão de 0,1% de MOS + 0,1% de  $\beta$ -glucanas) compondo um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Ao final do

experimento, após jejum de 24 horas, os peixes foram sedados com benzocaína (100 mg L<sup>-1</sup>) para biometria e coleta de material biológico.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (protocolo nº 2016-003).

### 3.2 Dietas experimentais

As matérias primas foram analisadas de acordo com *Association of official analytical chemists* (AOAC) (2000). O teor de matéria seca foi determinado pela diferença de peso antes e após a secagem das amostras moídas a 60°C por 24 h. As cinzas foram determinadas gravimetricamente a partir da amostra moída após o uso da mufla a 550°C por quatro horas. A proteína bruta foi calculada pela conversão de nitrogênio (% N × 6,25), o conteúdo de nitrogênio foi medido pelo método micro-Kjeldahl seguido de destilação e titulação. O extrato etéreo foi determinada gravimetricamente e extraída pelo método de Soxhlet usando éter de petróleo como solvente.

Quatro dietas experimentais isoenergéticas (3.534,65 kcal g<sup>-1</sup> de EB) e isoproteicas (400,60 g kg<sup>-1</sup>) foram formuladas para conter 0% (controle), 0,2% de MOS, 0,2% de β-glucanas, ou 0,1% de MOS + 0,1% de β-glucanas (Tabela 1). Os ingredientes dietéticos foram triturados em moinho MCS 280 (Moinhos Vieira, São Paulo, SP, Brasil) para obtenção do tamanho de partícula de 0,3 mm e a seguir pesados e misturados, sendo processados em uma extrusora laboratorial MX-40 (Inbramaq, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com capacidade de 40 kg h<sup>-1</sup>, para fabricação de extrudado de 2 mm de diâmetro. As dietas foram secas em estufa de ventilação forçada (MA 035/5, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) a 40°C por 24 h e armazenadas a -5°C, até o momento do uso.

**Tabela 1 – Formulação, composição aproximada das dietas.**

Ingredientes	Tratamentos (%)			
	DC	DG	DM	DMG
Farinha de vísceras	33,81	33,81	33,81	33,81
Farelo de soja 46,87%	28,60	28,60	28,60	28,60
Milho 7,88%	25,74	25,74	25,74	25,72
Farelo de trigo	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	0,83	0,83	0,83	0,83
MOS <sup>a</sup>	-	-	0,02	0,01
β -glucanas <sup>b</sup>	-	0,02	-	0,01
Sup. Vitamina/mineral <sup>c</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Hidroxitolueno Butilado	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

Fração	Composição Proximal Analisada				
	DC	DG	DM	DMG	Media ± DP
Matéria Seca % <sup>d</sup>	91,28	91,74	91,77	91,29	91,52±0,24
Proteína Bruta % <sup>d</sup>	39,82	40,00	40,05	40,36	40,06±0,19
Energia Bruta kcal/kg <sup>d</sup>	3.539,01	3.531,82	3.530,80	3.536,98	3.534,65±3,44
Extrato Etéreo % <sup>d</sup>	7,33	7,33	7,33	7,33	7,33±0,00
Extrato Não Nitrogenado % <sup>d</sup>	42,28	42,17	41,96	41,42	41,96±0,33
Fibra Bruta % <sup>d</sup>	2,54	2,19	2,30	2,65	2,42±0,19
Matéria Mineral % <sup>d</sup>	8,02	8,31	8,36	8,24	8,23±0,13

Fonte: Autoria própria (2021). Desvio padrão (DP). <sup>a</sup> Composição 1,3/1,6 β-glucanas purificadas (Macrogard) e <sup>b</sup> mananoligossacarídeos (ActiveMOS) (Biorigin, Lençóis Paulista - SP, Brasil). <sup>c</sup> Composição mineral-vitáminica (Tectron, Toledo - PR, Brasil) kg dieta - 1: vitamina A: 1.000.000UI, vitamina D3: 500.000UI, vitamina E: 20.000UI, vitamina K3: 500mg, vitamina B1: 1.900 mg, vitamina B2: 2.000 mg, vitamina B6: 2.400 mg, vitamina B12: 3.500 mg, niacina: 5.000 mg, ácido pantotênico: 4.000 mg, ácido fólico: 200 mg, biotina: 40 mg, vitamina C: 25g, colina: 100.000 mg, selênio: 70 mg, ferro: 12,5 g, cobre: 2.000 mg, manganês: 7.500 mg, zinco: 25 g, iodo: 200 mg, BHT: 300 mg. <sup>d</sup> Analisado de acordo com AOAC (2000).

As fontes purificadas do MOS (25 ± 3,0% de mananoligossacarídeos e 30 ± 3% de β-glucanas) e β-glucanas (mínimo 60% de 1,3 / 1,6 β-glucanas) vieram de produtos comerciais, as quais são compostos extraídos da parede celular de cepas selecionadas da levedura *S. cerevisiae* e adicionadas à dieta formulada de acordo com os tratamentos.



### 3.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho

Ao final do experimento, após de jejum de 24 horas, os peixes foram sedados com benzocaína (100 mg L<sup>-1</sup>) para biometria. Os peixes foram e medidos para calcular os índices de desempenho, considerando-se os seguintes parâmetros (NRC, 2011):

- Ganho de peso (g):  $GP = Pf - Pi$
- Consumo de ração (CR)
- Índice de conversão alimentar:  $ICA = \frac{CR}{GP}$
- Taxa de crescimento térmico:  $TCT = \frac{Pf^{1/3} - Pi^{1/3}}{\Sigma T D} 100$

Onde:  $Pi$  é peso inicial (g);  $Pf$  é peso final (g);  $T$  é temperatura da água em graus Célsius;  $D$  é tempo em dias; e  $e^b$  é coeficiente alométrico.

### 3.4 Morfologia intestinal

Ao final do experimento e depois de 24 h de jejum, seis peixes por tratamento foram eutanaziados com superdosagem de benzocaína (300 mg L<sup>-1</sup>) e posterior secção medular, para obtenção de amostras histológicas. Para avaliação histológica das estruturas intestinais, amostras da porção media do intestino dos peixes (2 cm aproximadamente), foram processadas segundo Ribeiro *et al.* (2012), com modificações parciais. As amostras foram fixadas em solução ALFAC (5 mL de formol 40%, 90 mL de álcool 70% e 5 mL de ácido acético glacial) por 16 horas, e depois, transferidas para solução álcool 70% permanecendo sob refrigeração até o momento do processamento. Após a fixação, o material foi desidratado em séries crescentes de álcool etílico (80% / 60min; 90% / 60min; 95% 60min; 100% 60min), e diafanizado (Álcool PA:Xilol PA (1:1) / 15min; Xilol PA / 15min ou até as peças ficaram translúcidas), para depois, ser incluído em resina plástica PARAPLAST. Os cortes histológicos das peças (7 µm de espessura) foram feitos em micrótomo automatizado CUT6062 (Slee Medical, Mainz, PP, Alemanha), fixados em lâminas com extremidade fosca e corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

As análises e documentação do material foi feita no microscópio ocular e com o auxílio do *software* ZEN 2012 *Blue Edition* (Carl Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha),

observando as vilosidades intestinais. A medida da altura das vilosidades foi baseada na distância do ápice das vilosidades até o início da camada muscular, e a mensuração foi posteriormente fotografada no aumento 10x.

### **3.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímica sanguínea**

Foram retiradas amostras de sangue de quatro peixes por repetição. Os peixes após jejum de 24 horas foram sedados com benzocaína (100 mg L<sup>-1</sup>), foi coletado sangue por meio de punção do vaso caudal com seringa plástica (3 mL) previamente heparinizadas.

#### **3.5.1 Contagem de eritrócitos**

A contagem de eritrócitos (Núm<sub>eritrócitos</sub> µL<sup>-1</sup>) foi realizada após diluição do sangue (1: 200) em um tubo de ensaio na proporção 0,02 mL de sangue para 4,0 mL de solução formol citrato (3,8 g citrato de sódio; 2,0 mL de formol 40% e água destilada 100 mL). Após homogeneização da solução a contagem foi feita em câmara de Neubauer, contando os eritrócitos contidos nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara.

#### **3.5.2 Porcentagem de hematócrito**

Foi determinada usando o método do microhematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971). Amostras sanguíneas homogeneizadas foram introduzidas em capilares para microhematócrito com uma das extremidades do capilar selada, e depois, processadas em centrífuga de microhematócrito DHM\_6 (Benfer, São Paulo, SP, Brasil) por 5 min e 10.000 rpm. A avaliação foi feita com auxílio da tabela de microhematócrito e expressa como Vol<sub>eritrócitos</sub> em 100 cm<sup>3</sup>.

### 3.5.3 Concentração de hemoglobina

A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973); após da coleta, 0,02 mL de sangue foram diluídos em 5 mL do reagente cor da hemoglobina e posteriormente homogeneizada a solução, depois de 10 minutos, as amostras foram centrifugadas por 15 min e 10.000 rpm para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, o sobrenadante recolhido para leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm, e os resultados expressos em g 100 mL<sup>-1</sup>.

### 3.5.4 Variáveis hematimétricas

As variáveis hematimétricas foram obtidas mediante as relações entre hematócrito e número de eritrócitos; taxa de hemoglobina e número de eritrócitos; e taxa de hemoglobina e hematócrito (WINTROBE, 1934) com as fórmulas seguintes:

$$VCM = \frac{Ht * 10}{\text{Número de eritrocitos}}$$

$$HCM = \frac{Hb * 10}{\text{Número de eritrocitos}}$$

$$CHCM = \frac{Hb * 10}{Ht}$$

Onde, VCM é volume corpuscular médio, HCM é hemoglobina corpuscular média e CHCM é concentração da hemoglobina corpuscular média.

### 3.5.5 Contagem total de leucócitos e trombócitos

A contagem total de leucócitos, trombócitos e diferencial de leucócitos foram realizadas em extensões sanguíneas corados com Rosenfeld modificado (May-Grünwald-Giemsa-Wright) de acordo com Tavares-Dias e Moraes (2003), em microscópio ótico de luz e objetiva 100x em óleo de imersão. A contagem total de

leucócitos e trombócitos foi realizada pelo método indireto (MARTINS *et al.*, 2004) utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Leucócitos } \mu\text{l}^{-1} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ leucócitos} * \text{Número de eritrócitos } \mu\text{l}^{-1}}{2000 \text{ eritrócitos na extensão sanguínea}}$$

$$\text{Trombócitos } \mu\text{l}^{-1} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ trombócitos} * \text{Número de eritrócitos } \mu\text{l}^{-1}}{2000 \text{ eritrócitos na extensão sanguínea}}$$

### 3.5.6 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem foi realizada segundo Martins *et al.* (2004), em que 200 células foram contadas em cada lâmina, e o resultado expresso em % de cada tipo celular, e depois, calculados o número absoluto de cada um com relação ao número total de leucócitos.

### 3.5.7 Concentração de proteína plasmática total

A proteína plasmática total (PPT) foi determinada em um refratômetro portátil WZ-301 (Megabrix, Curitiba, PR, Brasil) seguindo a metodologia de Sado, Bicudo e Cyrino (2008).

### 3.5.8 Concentração de glicose

Para determinação da concentração de glicose, uma alíquota de plasma (10  $\mu\text{L}$ ) por peixe foi adicionado a 1 mL de reagente enzimático K082 (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil). A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 10 minutos, após incubação, a densidade óptica (OD) da solução final foi medida em espectrofotômetro (Kasuki IL-227) em comprimento de onda de 512 nm.

### 3.6 Avaliação dos parâmetros imunológicos

#### 3.6.1 Atividade respiratória dos leucócitos

O sangue coletado com foi processado imediatamente após a coleta para determinar a atividade respiratória dos leucócitos (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2013). O método consiste na determinação colorimétrica das espécies reativas de oxigênio produzidas pela explosão respiratória dos leucócitos, que promove a redução do nitrobluetetrazólio (NBT) em um precipitado azul escuro dentro do fagócito denominado grânulos de formazan. Para dosagem do precipitado, 0,1 mL do sangue total foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25°C. Após incubação, 50 µL da suspensão homogeneizada foram colocados em um tubo de vidro com 1,0 mL de N, N-dimetil formamida (Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 minutos. A densidade óptica (DO) da solução final foi medida em espectrofotômetro IL-227 (Kasuaki, São Paulo, SP, Brasil) em comprimento de onda de 540 nm.

#### 3.6.2 Concentração de lisozima sérica e no muco

A concentração de lisozima sérica foi medida por ensaio turbidimétrico, segundo Abreu *et al.* (2009), por lise de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* L6876 (Sigma, St Louis, MO, USA), após a extração do soro das amostras (centrifugadas por 10 min a 600 rpm). Os níveis séricos de lisozima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram determinados pela equação de regressão linear ( $X = (Y + 0,0003) / 0,0002$  com coeficiente de determinação = 0,9051) da curva de calibração da lisozima (curva padrão de calibração pela quantificação das diferenças das densidades ópticas iniciais e finais). A redução da densidade óptica ( $\Delta$  DO) em 450 nm foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 26°C.

Para a determinação da concentração de lisozima no muco, foi utilizado o protocolo proposto por Ross e Moldeus (1991). Antes do abate para obtenção das amostras intestinais, seis peixes por tratamento foram sedados com benzocaína e transferidos para embalagens plásticas contendo 5 mL de solução de bicarbonato de amônia ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7,8) e massageados durante um minuto. O extrato com muco

foi transferido para tubos plásticos (50 mL), congelados a - 20°C e então liofilizados para posterior análise da concentração de lisozima do muco. O extrato do muco liofilizado foi ressuspenso em 5 mL de tampão fosfato e seguiu o mesmo procedimento da análise realizada para determinar a concentração de lisozima sérica.

### 3.6.3 Função fagocitária dos leucócitos

Para determinar a função fagocitária, 200 µL de sangue total foram colocados em microtubos de polipropileno e em seguida, 100 µL de solução com *A. hydrophila* ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) foram adicionados, incubados a 28°C por 30 minutos e homogeneizados a cada 10 minutos (PAZ *et al.*, 2019). Em seguida, extensões sanguíneas foram feitas em duplicata, e após a secagem, foram coradas, fixadas (May-Grünwald-Giemsa-Wright) e examinadas em microscópio óptico de luz com lente objetiva de imersão em óleo (100x). A atividade fagocitária (CAI; LI; MA, 2004) e o índice fagocitário (KAWAHARA; UEDA; NOMURA, 1991) foram realizadas utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Atividade Fagocitária (AF)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ macrófagos contendo bactérias}}{\text{N}^\circ \text{ total de macrófagos}} \cdot 100$$

$$\text{Índice Fagocitário (IF)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de bactérias fagocitadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células fagocíticas}}$$

## 3.7 Análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições cada. Os dados foram avaliados pelos testes de normalidade e homogeneidade (*Shapiro-Wilk* e *Bartlett*, respectivamente), quando necessário, os dados foram transformados para que ambas as premissas fossem satisfeitas (concentração da lisozima sérica e do muco, glicose, *burst* oxidativo e proteína plasmática total foram transformados com log<sub>10</sub>), sendo, então, submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando se verificou diferenças significativas, as análises passaram pelo teste de Tukey, considerando um intervalo de confiança de

5%, utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros de desempenho

Os resultados de desempenho zootécnico são apresentados na Tabela 2. Juvenis de tilápia de Nilo suplementados com  $\beta$ -glucanas (DG) apresentaram menor ( $P < 0,05$ ) consumo de ração, quando comparadas ao tratamento controle (sem suplementação), porém, eles não diferiram ( $P > 0,05$ ) dos outros tratamentos.

O ganho de peso, taxa de crescimento específico, índice de conversão alimentar e fator de condição não apresentaram diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos avaliados.

**Tabela 2 – Média e desvio padrão dos parâmetros de desempenho de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) suplementado com prebióticos por 90 dias.**

Parâmetro	Tratamentos				P-valor
	DC	DM	DG	DMG	
GP (g)	35,66 $\pm$ 4,36	34,31 $\pm$ 2,62	31,55 $\pm$ 3,14	31,57 $\pm$ 3,30	0,5655
CR (g)	58,43 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	49,85 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	45,94 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	48,56 $\pm$ 00,6 <sup>ab</sup>	0.0373
CTC (%)	0,73 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,07	0,5654
ICA	1,64 $\pm$ 0,08	1,46 $\pm$ 0,12	1,47 $\pm$ 0,13	1,54 $\pm$ 0,13	0,2741

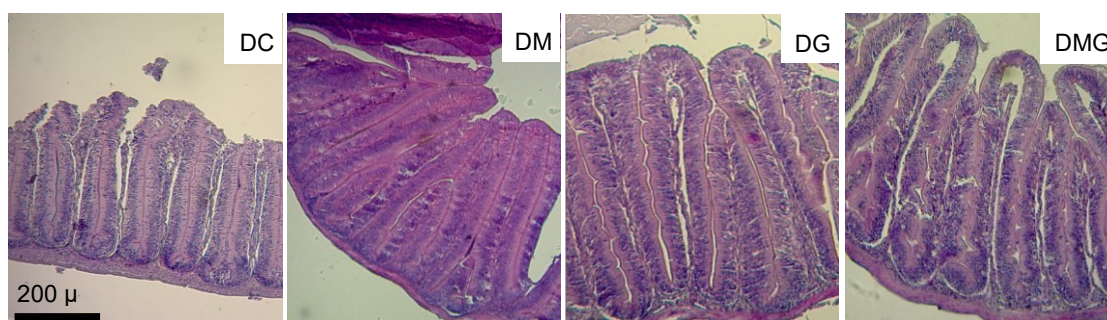
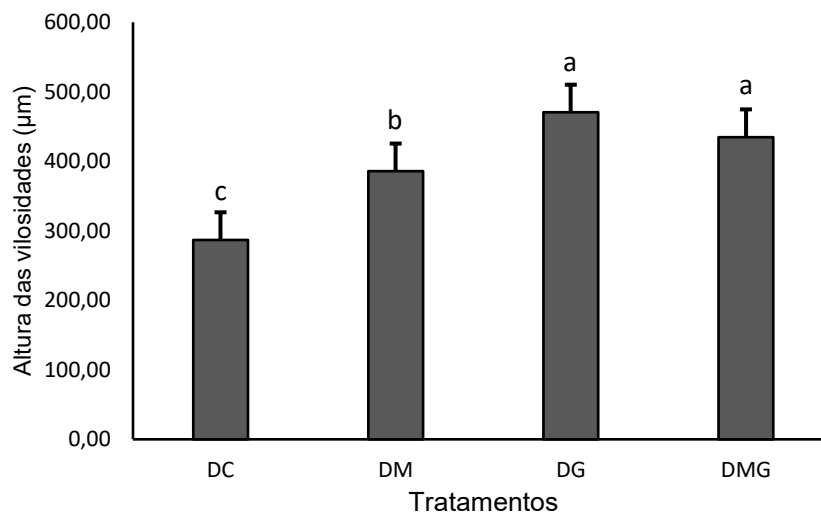
Fonte: Autoria própria (2021). Dieta controle (DC), dieta com 0,2% MOS (DM), dieta com 0,2%  $\beta$ -glucanas (DG), dieta com 0,1% MOS e 0,1%  $\beta$ -glucanas (DMG). Ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), taxa de crescimento específico (TCE), índice de conversão alimentar (ICA). Médias na mesma linha, seguidas de diferentes letras sobrescritas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

### 4.2 Morfologia intestinal

Com a inclusão de prebióticos nas dietas foi constatado aumento significativo na altura das vilosidades intestinais dos peixes quando comparados à dieta controle. As dietas com inclusão de 0,2% de  $\beta$ -Glucana e 0,1% de MOS + 0,1% de  $\beta$ -Glucana apresentaram maior altura de vilosidades do que a dieta com 0,2% de MOS (Figura 3A). (Figura 3B).



**Figura 2 – Altura das vilosidades intestinais de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) suplementadas com prebióticos por 90 dias.**



Fonte: Autoria própria (2021). Dieta controle (DC), dieta com 0,2% MOS (DM), dieta com 0,2%  $\beta$ -glucanas (DG), dieta com 0,1% MOS e 0,1%  $\beta$ -glucanas (DMG). Barra = 200 micras. Coloração HE. Diferentes letras acima de cada coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

### 4.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

A inclusão de prebióticos nas dietas não apresentou efeito ( $P>0,05$ ) sobre as variáveis hematológicas e parâmetros bioquímicos do sangue (Tabela 3).

**Tabela 3 – Média e desvio padrão do eritrograma, leucograma, trombograma e parâmetros bioquímicos da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) suplementada com prebióticos por 90 dias.**

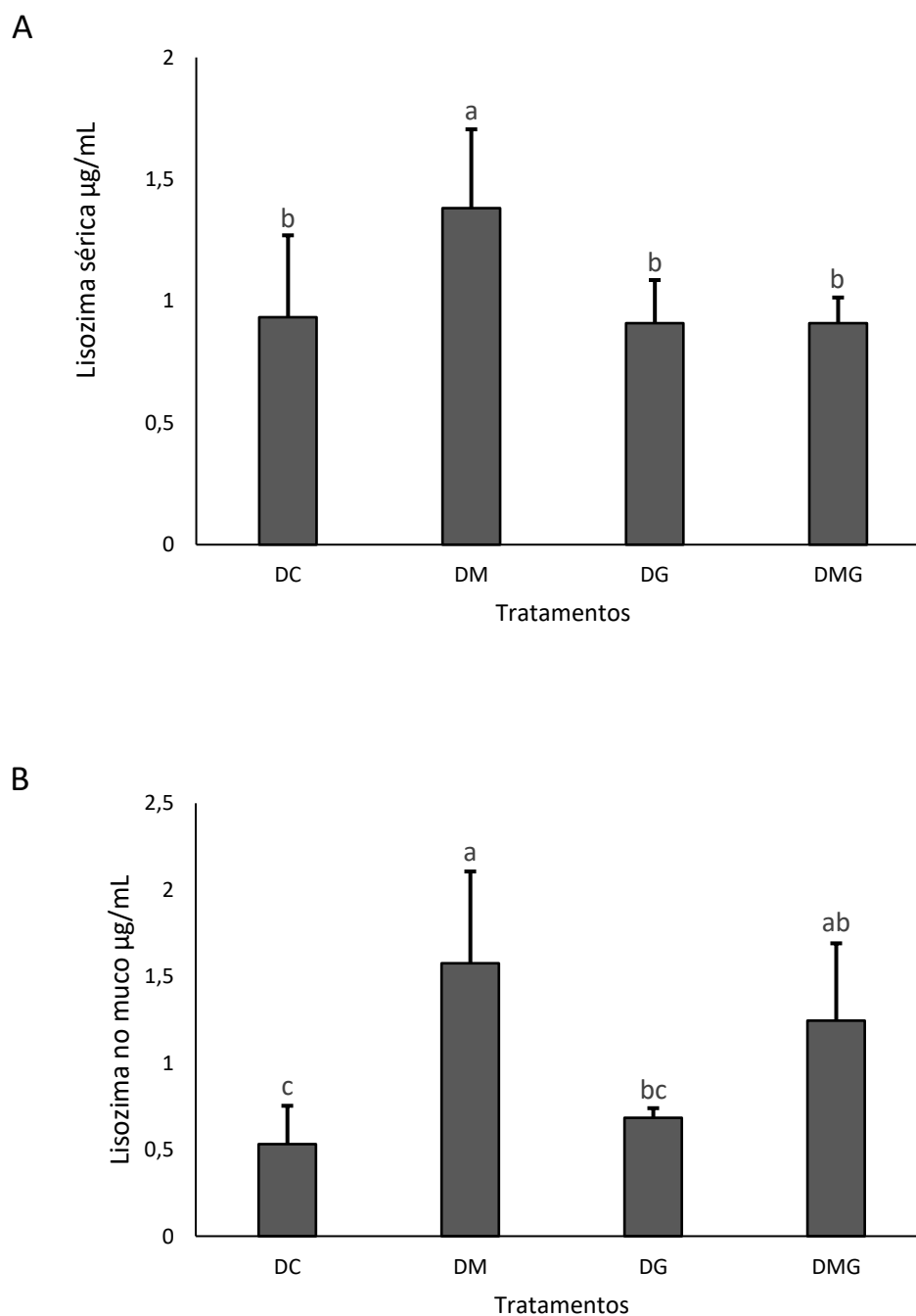
Parâmetro	Tratamentos (Média ± Desvio Padrão)				P-valor
	DC	DM	DG	DMG	
<b>Eritrograma</b>					
Er ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	2,18 ± 0,31	2,23 ± 0,17	2,41 ± 0,52	2,29 ± 0,45	0,5577
Ht (%)	24,64 ± 4,11	27,64 ± 4,41	26,44 ± 5,98	24,16 ± 0,06	0,3182
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	7,69 ± 2,13	7,80 ± 2,32	7,70 ± 2,32	7,91 ± 2,85	0,9956
VCM (fL)	113,69 ± 15,05	119,15 ± 16,55	111,52 ± 24,06	105,55 ± 10,95	0,2910
HCM (pg)	35,98 ± 10,05	33,02 ± 8,83	31,99 ± 9,97	33,84 ± 7,58	0,7705
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	31,30 ± 6,79	28,04 ± 8,50	32,17 ± 13,36	32,65 ± 9,49	0,7072
<b>Leucograma e Trombograma (<math>10^3 \mu\text{L}^{-1}</math>)</b>					
Leucócitos	57,40 ± 15,39	57,13 ± 20,83	52,30 ± 13,15	57,09 ± 16,72	0,8836
Trombócitos	64,38 ± 9,83	64,36 ± 8,99	66,08 ± 14,42	66,47 ± 13,14	0,9706
Linfócitos	41,15 ± 13,08	45,60 ± 14,78	41,02 ± 11,28	46,37 ± 13,65	0,7008
Neutrófilos	10,56 ± 3,17	7,63 ± 4,00	7,68 ± 1,97	8,14 ± 4,19	0,1701
Monócitos	5,67 ± 2,07	3,91 ± 2,44	3,94 ± 1,61	4,19 ± 1,92	0,1064
<b>Bioquímica sanguínea</b>					
PPT (g dL <sup>-1</sup> )	5,51 ± 0,43	5,70 ± 0,39	5,79 ± 0,31	5,32 ± 0,40	0,2987
Glicose (mg dL <sup>-1</sup> )	44,69 ± 13,63	52,24 ± 12,93	44,96 ± 13,07	52,05 ± 9,45	0,4885

**Fonte: Autoria própria (2021). Dieta controle (DC), dieta com 0,2% MOS (DM), dieta com 0,2%  $\beta$ -glucanas (DG), dieta com 0,1% MOS e 0,1%  $\beta$ -glucanas (DMG). Contagem de eritrócitos (Er), hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina (Hb), volume corpuscular média (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), proteína plasmática total (PPT).**

#### 4.4 Parâmetros imunológicos

As respostas imunes não específicas dos peixes após 90 dias a baixa temperatura, foram estatisticamente influenciadas pelo uso de prebióticos nas dietas. A suplementação dietética com mananoligossacarídeos aumentou significativamente a concentração da lisozima sérica quando comparada aos demais tratamentos (Figura 4A). Da mesma forma, os peixes que receberam as dietas DM e DMG exibiram a maior concentração de lisozima no muco ( $P < 0,05$ ) quando comparados com DC. A suplementação com 0,2% de  $\beta$ -Glucana não melhorou a concentração de lisozima no muco em relação ao tratamento controle (Figura 4B).

Figura 3 – Níveis de lisozima sérica (A) e lisozima no muco (B) de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) suplementadas com prebióticos por 90 dias.

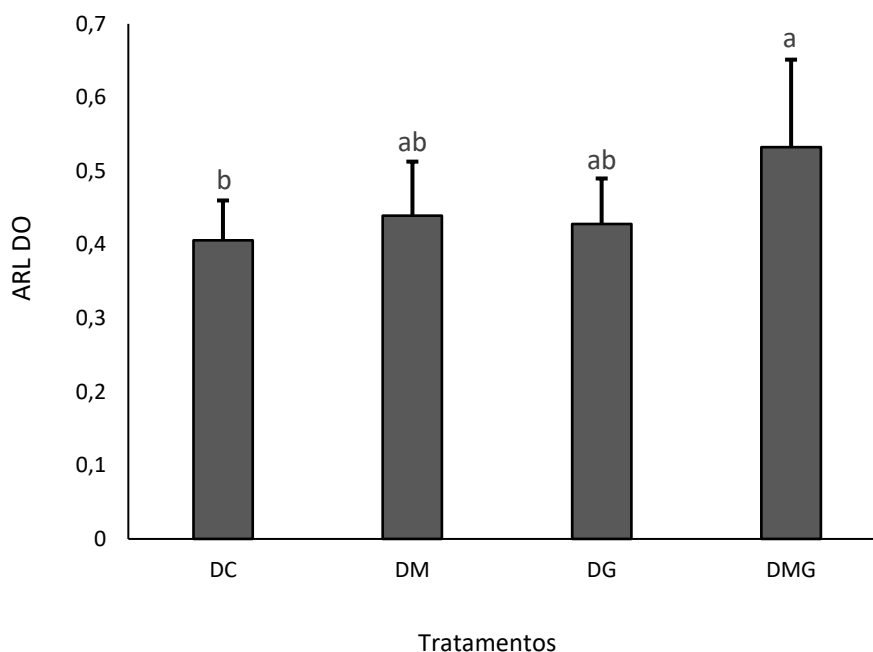


Fonte: Autoria própria (2021). Dieta controle (DC), dieta com 0,2% MOS (DM), dieta com 0,2%  $\beta$ -glucanas (DG), dieta com 0,1% MOS e 0,1%  $\beta$ -glucanas (DMG). Diferentes letras acima de cada coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

A atividade respiratória dos leucócitos foi significativamente afetada pela suplementação de prebióticos. Os peixes alimentados com DMG apresentaram a

maior atividade respiratória, quando comparados com peixes alimentados com a dieta controle. Não houve diferença na produção de EROs ( $P>0,05$ ) entre os peixes alimentados com DM, DG e DC (Figura 5).

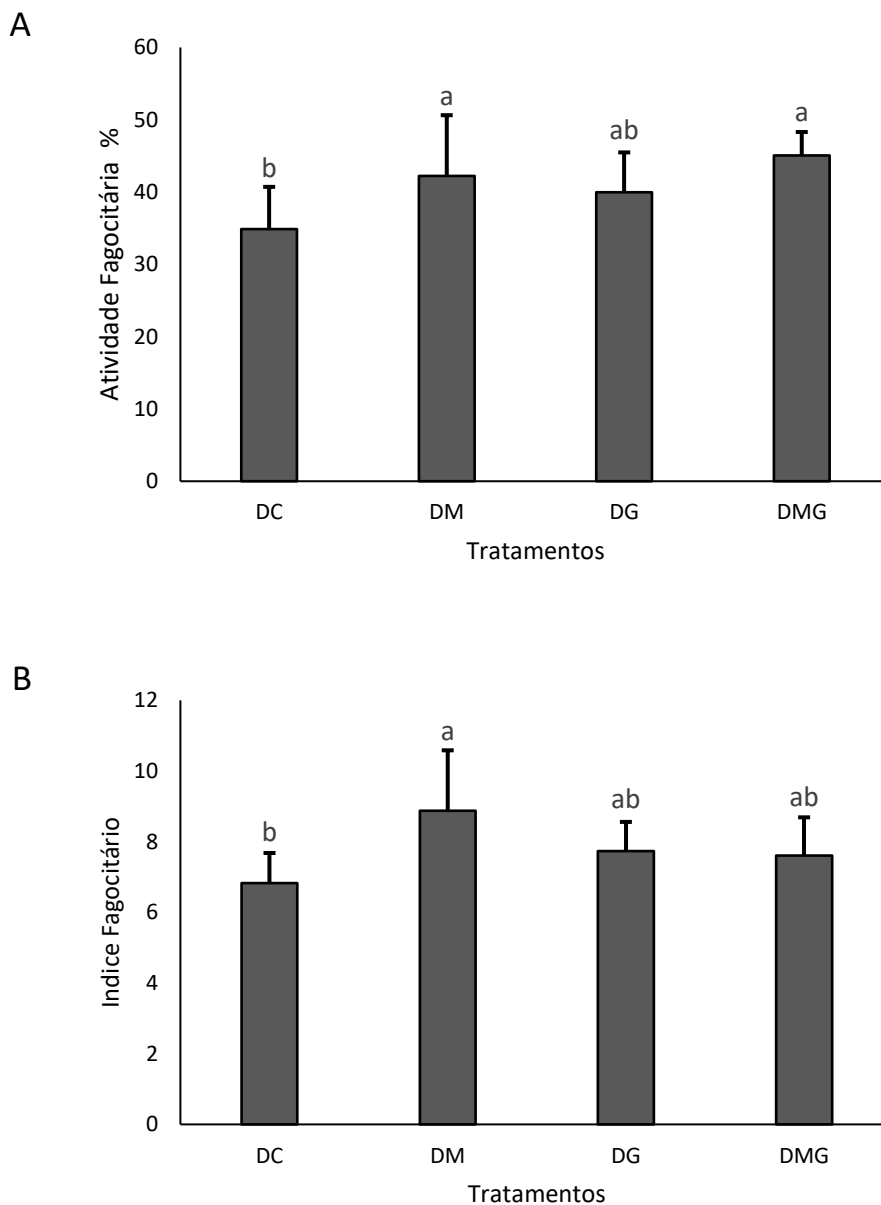
**Figura 4 – Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) suplementadas com prebióticos por 90 dias.**



**Fonte: Autoria própria (2021). Dieta controle (DC), dieta com 0,2% MOS (DM), dieta com 0,2%  $\beta$ -glucanas (DG), dieta com 0,1% MOS e 0,1%  $\beta$ -glucanas (DMG). Densidade óptica (DO). Diferentes letras acima de cada coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).**

Após o período experimental, a função fagocitária foi superior ( $P<0,05$ ) nos peixes alimentados com prebióticos, no entanto, a atividade fagocitária foi maior ( $P<0,05$ ) apenas nos peixes tratados com DM e DMG quando comparado aos alimentados com DC (Figura 6A). O índice fagocitário dos peixes alimentados com mananoligossacarídeos foi superior ( $P<0,05$ ) ao tratamento controle (Figura 6B).

Figura 5 – Atividade fagocitária (A) e índice fagocitário (B) dos leucócitos nas tilápia do Nilo (*O. niloticus*) suplementadas com prebióticos por 90 dias.



Fonte: Autoria própria (2021). Dieta controle (DC), dieta com 0,2% MOS (DM), dieta com 0,2%  $\beta$ -glucanas (DG), dieta com 0,1% MOS e 0,1%  $\beta$ -glucanas (DMG). Diferentes letras acima de cada coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a temperatura média da água diminuiu o metabolismo dos peixes, restringindo diminuindo as taxas de alimentação. Em organismos ectotérmicos a atividade metabólica está diretamente influenciada pela temperatura da água (VAN MUISWINKEL; VERVOORN-VAN DER WAL, 2006), e o desempenho produtivo da tilápia do Nilo pode ser severamente afetado por baixas temperaturas (DOS SANTOS; MARECO; SILVA, 2013; HASSAAN *et al.*, 2019; MAGOUZ *et al.*, 2020; NOBREGA *et al.*, 2020), diminuindo o consumo de alimento e retardando o crescimento (MOURA *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2020).

A suplementação prebiótica não influenciou os parâmetros de desempenho produtivo de tilápias de Nilo. Da mesma forma, a adição de MOS ou  $\beta$ -glucanas separadamente, não proporcionou efeito positivo sobre os parâmetros de desempenho para tambaqui (CHAGAS *et al.*, 2013), pacu (SADO; BICUDO; CYRINO, 2014) e tilápia do Nilo (SADO *et al.*, 2015; DAWOOD *et al.*, 2020d), possivelmente devido ao fato de os peixes não terem sido desafiados até a avaliação dos parâmetros produtivos. Igualmente, a associação dos prebióticos MOS e  $\beta$ -glucana, não melhorou o desempenho produtivo de tilápias de Nilo (GARCIA; SANTOS; MORAES, 2011), é provável que a diferença de peso inicial possa ter mascarado o efeito das dietas prebióticas nos peixes.

O uso de mananoligossacarídeos e  $\beta$ -glucanas para melhorar o desempenho produtivo em diversas espécies de peixes tem sido amplamente relatado (EBRAHIMI *et al.*, 2012; WELKER *et al.*, 2012; SELIM; REDA, 2015; PILARSKI *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2018; MAGOUZ *et al.*, 2019). Neste trabalho, a suplementação com 0,2% de  $\beta$ -glucanas na dieta de tilápias de Nilo reduziu significativamente o consumo de ração em relação à dieta controle, não entanto, sem afetar o desempenho produtivo. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos para a mesma espécie sob condições de temperatura adequada (SHELBY *et al.*, 2009), porém, Selim e Reda (2015) detectaram menor consumo de ração com aumento significativo na conversão alimentar e o ganho de peso em tilápias de Nilo suplementadas com MOS e  $\beta$ -glucanas dietéticas. A suplementação com  $\beta$ -glucanas aumentou ( $P < 0,05$ ) o consumo de alimento, afetando positivamente o peso final e a eficiência alimentar da tilápia do Nilo (WELKER *et al.*, 2012). Da mesma forma, Koch *et al.* (2011) observaram maior

ganho de peso em peixes suplementados com  $\beta$ -glucanas, sem influenciar o consumo de ração.

Ainda não foi totalmente esclarecido como a  $\beta$ -glucana dietética causa melhorias no desempenho produtivo dos peixes, também, não está claro por que os efeitos de aumento do crescimento da  $\beta$ -glucana ocorrem em algumas espécies aquáticas e não em outras (KÜHLWEIN *et al.*, 2014). As  $\beta$ -glucanas dietéticas podem melhorar o coeficiente de digestibilidade das rações, principalmente da fração proteica (BURR *et al.*, 2008), promovendo melhor absorção do alimento ao nível do intestino. Além disso, a degradação da glucana pela glucanase nas glândulas digestivas promove o uso de maior quantidade de proteínas, as quais exercem um efeito protetor em nível intestinal (ABU-ELALA *et al.*, 2018). No entanto, Dalmo e Børgwald (2008), sugeriram que os efeitos no desempenho podem depender da concentração da  $\beta$ -glucana na dieta, sua solubilidade, as espécies de peixes, a temperatura da água e a duração do período de alimentação.

O principal modo de ação do MOS no crescimento dos peixes consiste na melhora da funcionalidade da membrana do enterócito em termos de integridade e taxas de transporte, devido a mudanças nas proporções e composição do muco (TORRECILLAS *et al.*, 2015b). O MOS pode impedir que bactérias prejudiciais se fixem à manose nas células epiteliais intestinais, evitando a atrofia das microvilosidades por inflamação de patógenos e suas toxinas (RAN *et al.*, 2015). A suplementação de mananoligossacarídeo aumenta a secreção de muco como mecanismo de defesa eficaz da superfície mucosa do hospedeiro, reduzindo a taxa de adesão do potencial patógeno ao epitélio e evitando sua translocação (TORRECILLAS; MONTERO; IZQUIERDO, 2014). A melhora da proteção intestinal devido ao aumento de tamanho e densidade de células secretoras de mucina (células caliciformes), é um efeito positivo da MOS da dieta em peixes (CHEE *et al.*, 2010; CAIPANG; LAZADO, 2015).

A suplementação com a levedura *S. cerevisiae* integra promoveu ganho de peso e aumentou a densidade e o comprimento das microvilosidades intestinais da tilápia do Nilo (RAN *et al.*, 2015). Não obstante, juvenis de salmão do Atlântico alimentados com ditas contendo MOS não apresentaram diferenças no desempenho produtivo, mesmo quando o prebiótico promoveu o aumento da altura e densidade das microvilosidades (DIMITROGLOU *et al.*, 2011). Da mesma forma, Akter *et al.* (2016), relataram que peixes da espécie panga (*Pangasianodon hypophthalmus*)

suplementados com 0,6 ou 0,8% de MOS da dieta mostraram melhorias no crescimento e maior comprimento de microvilosidades em comparação com peixes que receberam 0,2% de MOS ou a dieta controle.

Neste experimento, os processos metabólicos foram significativamente afetados pelas condições hipotérmicas, o que poderia mascarar os efeitos prebióticos das dietas nos peixes. A produção de maior quantidade de muco pela ação de MOS, pode dificultar o efeito enzimático, aumentando a viscosidade do bolo alimentar e dificultando a interação das enzimas com o alimento (HISANO *et al.*, 2008), dessa forma, a digestibilidade e a absorção dos nutrientes podem ter sido afetadas neste estudo, principalmente por a menor interação enzimática do bolo alimentar com enzimas e enterócitos intestinais. A produção de muco pelas células da mucosa intestinal pode alterar a digestão e a absorção de nutrientes e desta forma, interferir no desempenho zootécnico.

Neste estudo, não foram realizadas análises de microscopia eletrônica para determinar a integridade das microvilosidades intestinais após o período experimental, portanto, não foi possível elucidar melhor os efeitos da suplementação de probióticos no desempenho. Como a absorção de nutrientes está relacionada ao comprimento das microvilosidades, verificou-se que uma baixa concentração de MOS (0,1-0,2%) induziu uma melhor morfologia intestinal em cobia (*Rachycentron canadum*) (SALZE *et al.*, 2008). Também, a suplementação com MOS na dieta de pangas promoveu a resposta de crescimento e a atividade de enzimas digestivas, o que pode ser explicado por um efeito positivo do prebiótico na morfologia do intestino dos peixes (AKTER *et al.*, 2016).

O epitélio intestinal dos peixes é uma barreira seletiva que enfrenta uma tarefa complexa: bloquear patógenos e substâncias nocivas ao mesmo tempo que permite a absorção de nutrientes e água (SUNDH; SUNDELL, 2015). A análise histológica de este estudo revelou que a altura das vilosidades intestinais aumentou significativamente com a suplementação dietética de probióticos. Resultados semelhantes foram relatados para tilápias do Nilo com a aplicação combinada de MOS e  $\beta$ -glucanas. Quando a parede celular da levedura *S. cerevisiae* foi incorporada à dieta da tilápia do Nilo, foi verificado um aumento na superfície da mucosa intestinal (HISANO *et al.*, 2006). Da mesma forma, um aumento na altura das vilosidades foi observado após suplementos dietéticos em níveis de 0,5% a 1% por 6 dias (CHEN *et al.*, 2019). Verificou-se o aumento significativo da altura das vilosidades, além do



número de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais do intestino de peixes suplementados com 0,3% desses prebióticos por 60 dias, que promoveu ganho de peso e diminuição do fator de conversão alimentar (SELIM; REDA, 2015).

A inclusão dietética de 0,4% de MOS em *O. niloticus* aumentou a altura das vilosidades intestinais sem afetar o desempenho produtivo (HA *et al.*, 2017). O uso de 0,4% de MOS na dieta também melhorou a altura das vilosidades de tilápia do Nilo após 30 dias de suplementação, mas no dia 60, diminuiu em relação ao grupo controle, e sem alterar o desempenho zootécnico em nenhum dos períodos (CECHIM *et al.*, 2015). Não entanto, a suplementação com 0,1% de  $\beta$ -glucanas não influenciou na altura das vilosidades ou ganho de peso nesta espécie, porém, o probiótico promoveu a melhor conversão alimentar (DAWOOD *et al.*, 2020d). Sem os efeitos adversos da temperatura, tanto o MOS quanto a  $\beta$ -glucana podem melhorar a estrutura intestinal com pouca ou nenhuma consequência no desempenho produtivo do tilápia do Nilo.

A altura das vilosidades intestinais aumentou com a inclusão de 0,2% - 0,3% de taurina e ácidos graxos de cadeia média na dieta de tilápias do Nilo mantidas em condições de temperatura sub-ótimas, melhorando também o estado imunológico e o desempenho produtivo (MAGOUZ *et al.*, 2020). Esse resultado é consistente com a afirmação de que os ácidos graxos de cadeia média e alta, além de um melhor equilíbrio de aminoácidos, melhoram a função intestinal e fisiológica de peixes submetidos ao estresse pelo frio (XU; ZHENG; DING, 2017; NOBREGA *et al.*, 2020). O MOS poderia ser um reforçador da integridade e funcionalidade intestinal dos peixes, juntamente com a estimulação do sistema imunológico (TORRECILLAS; MONTERO; IZQUIERDO, 2014), por outro lado, verificou-se que em situações adversas, as  $\beta$ -glucanas conferem proteção ao tecido intestinal de peixes (DAWOOD *et al.*, 2020e). Neste estudo, a melhora da estrutura intestinal foi verificada tanto pela ação prebiótica conjunta de MOS e  $\beta$ -glucanas quanto por sua ação isoladamente, mesmo em condições de hipotermia.

A eficiência de absorção de nutrientes e a saúde do trato intestinal de animais aquáticos estão altamente correlacionadas com vilosidades intestinais mais altas (CAIPANG; LAZADO, 2015; CHEN *et al.*, 2019). Assim, no presente estudo foi constatado que a suplementação probiótica favorece a estrutura intestinal, em menor proporção com MOS, e com maior eficácia com  $\beta$ -glucanas ou a mistura de ambos prebióticos, além de contribuir à manutenção das funções imunológicas inatas em

condições de estresse crônico por baixa temperatura da água. Apesar de não tenham sido encontradas diferenças no comportamento produtivo dos peixes após a suplementação dietética com prebióticos, deve-se levar em consideração o baixo consumo causado pelas condições hipotérmicas a que os peixes foram submetidos. No entanto, foi observada uma melhor estrutura na morfologia intestinal, que é um dos fatores que permitiria uma melhor absorção dos nutrientes quando a tilápia entra no conforto térmico, melhorando os parâmetros produtivos uma vez que o período de inverno passa para um ambiente mais favorável para os peixes. De acordo com Dimitroglou *et al.* (2011), melhorias na morfologia intestinal não só têm um impacto positivo no uso de alimentos, também melhoram a saúde do epitélio da mucosa e aumentam sua capacidade de bloquear infecções bacterianas oportunistas.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são critérios importantes que devem ser analisados quando os animais são expostos a situações desfavoráveis, portanto podem ser usados como indicadores biológicos no monitoramento da higidez dos peixes (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013; BURGOS-ACEVES; LIONETTI; FAGGIO, 2019). A temperatura influencia os processos hematológicos dos peixes (DONALDSON *et al.*, 2008), e parâmetros como a concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e hematócrito são susceptíveis a mudanças de temperatura, diminuindo suas concentrações após estímulo pelo frio (FALCON *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2017). Após do período experimental, foi observado que Et, Ht e VCM estão dentro do considerado normal em peixes sadios (HRUBEC; CARDINALE; SMITH, 2000; TAVARES-DIAS *et al.*, 2009; GRANT, 2015). Concentração elevada de hemoglobina indica boa capacidade do peixe para respirar, assim como ausência de anemias (HRUBEC; CARDINALE; SMITH, 2000). Os resultados para Hb foram similares aos obtidos por Magouz *et al.* (2020) em condições de temperatura semelhantes, e por Fernandes *et al.* (2010), em experimento com desafio por hipotermia, ambos casos com tilápia do Nilo.

Leucócitos no sangue periférico de peixes teleósteos sofrem alterações em seu número e proporção após serem submetidos a baixas temperaturas (KORTET; VAINIKKA, 2008). O número de linfócitos pode diminuir pelos efeitos do cortisol plasmático (BARROS *et al.*, 2014) como consequência da exposição a temperaturas abaixo do ideal, também devido à supressão na geração de linfócitos T (PRESS, 1998), e por maior apoptoses em linfócitos B na circulação sanguínea (DONALDSON *et al.*, 2008). Linfopenia, neutrofilia e monocitose foram descritos na tilápia do Nilo

associados a temperatura sub-ótima (FALCON *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2014). Neste trabalho, o percentual relativamente baixo para linfócitos, que estão relacionados à produção de anticorpos e resposta celular humoral, e alto para neutrófilos e monócitos, que formam a primeira linha de defesa celular contra agentes invasores, não podem ser verificados como alterações leucocitárias devido à ausência da quantificação prévia ao estresse pelo frio. Mesmo quando não houve diferença no número total de leucócitos entre tratamentos neste experimento, a atividade dos leucositos (principalmente monócitos e neutrófilos) foi influenciada pela inclusão de probióticos dietéticos.

O sistema imunológico dos peixes pode atenuar suas funções durante o estresse por baixa temperatura da água e conseqüentemente, a resistência a doenças pode diminuir (THOMPSON *et al.*, 2015; MAGOUZ *et al.*, 2020). Em geral a imunidade específica é taxativamente afetada pela hipotermia (MAGNADÓTTIR, 2006; KORTET; VAINIKKA, 2008), contrariamente, e como possível mecanismo de compensação, os parâmetros imunes celulares e humorais inatos podem manter suas funções a temperatura sub-ótima (VAN MUISWINKEL; VERVOORN-VAN DER WAL, 2006; VELMURUGAN; CHAN; WENG, 2019). No entanto, a correlação positiva entre a atividade da lisozima plasmática e a temperatura da água foi relatada em várias espécies de peixes, incluindo a tilápia do Nilo (SAURABH; SAHOO, 2008). Os resultados de nosso trabalho mostraram que mesmo em condições de temperatura sub-ótima, houve melhora dos parâmetros imunológicos (lisozima, atividade respiratória e atividade fagocitária) quando os peixes receberam dietas suplementadas com prebióticos.

A lisozima é uma importante molécula de defesa do sistema imunológico inato, é uma enzima mucolítica de origem leucocitária (SAURABH; SAHOO, 2008). A principal fonte de lisozima são monócitos, macrófagos e granulócitos polimorfonucleados. Entretanto, os níveis elevados em tecidos sujeitos a alta invasão microbiana (muco, brânquias, trato alimentar) enfatizam o papel de defesa da lisozima, especialmente nos mecanismos de defesa de primeira linha (LIE *et al.*, 1989).

No presente estudo, a adição de  $\beta$ -glucanas ou sua combinação com MOS não aumentou a concentração desta enzima em nível sérico, da mesma forma, Schmidt *et al.* (2017), não detectaram efeitos imunomoduladores de MOS e  $\beta$ -glucanas incorporados a 0,2% na ração para linguado do Pacífico (*Platichthys*

*Stellatus*) sob ambiente temperado, o que pode ser causado por diminuições de temperatura na água, que afetam a atividade enzimática da lisozima (BAGNI *et al.*, 2005; HAYWARD; BOTT; NOWAK, 2009). Em contraste, um aumento na concentração de lisozima foi encontrado para tilápia do Nilo suplementada com MOS e  $\beta$ -glucanas em uma proporção de 0,2% (ABU-ELALA *et al.*, 2018) ou 0,25% (CHEN *et al.*, 2019) na dieta, no entanto, sob condições ambientais favoráveis para a espécie.

A concentração de lisozima aumentou significativamente com a adição de MOS à dieta. Este resultado é comparável ao de Levy-Pereira *et al.* (2018), que obtiveram aumento na concentração sérica de lisozima em tilápia do Nilo mantidas numa faixa de temperatura ótima e suplementadas com níveis de inclusão de 0,1% até 1,5% de MOS na dieta. A ação coadjuvante do MOS na resposta imune pode estar relacionada ao estímulo na secreção de lectina ligante à manose (MBL) que se une à parede celular da bactéria ativando o complemento por via da lectina (TORRECILLAS; MONTERO; IZQUIERDO, 2014), assim, alguns componentes do sistema complemento estimulam tanto a fagocitose quanto a exocitose de enzimas líticas (HOLLAND; LAMBRIS, 2002; URIBE *et al.*, 2011).

Os valores de concentração de lisozima no muco também foram influenciados pela ação conjunta de 0,1% de MOS + 0,1% de  $\beta$ -glucanas adicionado na dieta. O aumento da ação bactericida da lisozima do muco e sérica tem sido descrito como efeito da inclusão de  $\beta$ -glucanas na dieta da dourada (*Pagrus major*), embora sem aumento de sua concentração (DAWOOD *et al.*, 2017).

Poucos artigos abordam a relação entre a distribuição da lisozima de peixe nos tecidos. A distribuição tecidual dessa enzima foi estudada em 20 espécies de peixes, concluindo que os rins apresentaram os maiores níveis de atividade de lisozima, seguidos em ordem decrescente pelo trato digestório, baço, muco, soro, brânquias, fígado e músculo, esse padrão é consistente com o importante papel que as lisozimas desempenham na defesa do corpo (LIE *et al.*, 1989), contudo, SUBBOTKINA; SUBBOTKIN (2003), indicaram uma distribuição decrescente diferente em 12 espécies de peixes de 5 ordens diferentes, com a maior concentração no rim, seguida pelo baço e fígado e finalmente no soro sanguíneo, além de mostrar que a distribuição da concentração de lisozima é semelhante em espécies relacionadas, mas difere essencialmente da dos representantes de outras ordens, tornando difícil fazer referência aos valores encontrados entre lisozima no soro e lisozima no muco neste experimento.

Na tilápia do Nilo, a atividade da lisozima foi maior no soro do que no muco quando um agente probiótico (*Lactobacillus plantarum*) foi suplementado à dieta, no entanto, quando o probiótico foi diluído em água, a maior atividade foi detectada no muco (TAOKA *et al.*, 2006). A atividade da lisozima presente no muco cutâneo e no soro de dourada (*Sparus aurata*), apresentou valores semelhantes (GUARDIOLA *et al.*, 2014). É difícil estabelecer uma relação entre as duas fontes de lisozima encontradas neste estudo, uma vez que dentro da mesma espécie pode haver diferenças na relação com a lisozima sérica e o muco cutâneo, como apontado para enguia europeia (*Anguilla anguilla*), cuja atividade da lisozima em peixes mantidos na fase de engorda foi maior no soro do que no muco, enquanto nos peixes mantidos em baixa densidade ocorreu o inverso (NIELSEN; ESTEVE-GASSENT, 2006).

Parâmetros imunes inatos como atividade respiratória de leucócitos e atividade fagocitária, são utilizados como indicadores da atividade leucocitária (MAGNADÓTTIR, 2006; BILLER; TAKAHASHI, 2018). A suplementação dietética com 0,1% de MOS e 0,1% de  $\beta$ -glucanas conferiu uma melhora significativa na produção de EROs por células fagocíticas. Em outro estudo com *O. niloticus*, observou-se que a atividade respiratória dos leucócitos foi estimulada após 30 e 60 dias de administração contínua de MOS em concentrações de 0,06-0,08% na dieta sob condições de temperatura aceitáveis (HA *et al.*, 2017). Também, foi descrito aumento da atividade respiratória dos leucócitos de tilápia do Nilo mantida com dietas contendo 0,1% de  $\beta$ -glucanas por um período de 6 semanas de forma contínua e intermitente (4 semanas com prebiótico + 2 semanas sem prebiótico), sendo que a dosagem intermitente obteve melhor resposta do que a dosagem contínua do prebiótico, sendo ambas superiores ao controle (WELKER *et al.*, 2012), da mesma forma, relatou-se um aumento neste parâmetro após 30 dias de suplementação dietética com diferentes  $\beta$ -glucanas em tilápia do Nilo (PILARSKI *et al.*, 2017), o que permite inferir que a concentração, protocolo alimentar e origem da molécula interferem na sua eficácia.

As células fagocíticas reconhecem os epítopos presentes nos antígenos de microrganismos (*Pathogens associated molecular patterns* – PAMPs), por meio de receptores associados (*Pattern Recognition Receptors* – PRRs), sem nunca reconhecer componentes do próprio corpo (VAN MUISWINKEL; VERVOORN-VAN DER WAL, 2006; BILLER; TAKAHASHI, 2018). Imunomoduladores frequentemente têm características moleculares semelhantes à composição de PAMPs (HA *et al.*, 2017). Existem PRRs para  $\beta$ -glucanas presentes em macrófagos, que irão

desencadear respostas imunes ao interagir com esses polissacarídeos na forma de PAMPs (CAIPANG; LAZADO, 2015). Prebióticos como MOS, derivado de paredes celulares de levedura com carboidratos ricos em manana, podem induzir um PRRs estimulando a imunidade celular inespecífica (HA et al., 2017). Neutrófilos e monócitos produzem EROs, sendo uma estratégia do sistema imunológico para a destruição de diversos patógenos após sua detecção (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2013).

Em um experimento com tilápias (*Oreochromis mossambicus*) saudáveis e submetidas a uma temperatura de 12°C por 1, 4, 8, 24 e 48 horas, observou-se que a atividade respiratória dos leucócitos aumentou significativamente após 8 horas, com o máximo após 24 horas, sendo que após esse período, a resposta diminuiu (VELMURUGAN; CHAN; WENG, 2019), indicando uma resposta imune positiva a este parâmetro após de estresse agudo em até 24 horas. A associação de MOS e  $\beta$ -glucana incorporados em níveis crescentes de 0,2 até 0,8% na dieta também aumentou a atividade respiratória dos leucócitos em pacu (SOARES *et al.*, 2018). No presente experimento não houve resposta significativa na produção de EROs na tilápia tratada com MOS ou  $\beta$ -glucanas após um período de 90 dias de exposição a temperatura sub-ótima (exposição crônica), neste caso poderia mediar a imunossupressão causada por extenuação da imunidade inata. A ativação constante de células fagocíticas, com produção permanente de EROs devido à sua atividade respiratória, bem como a consequente ativação de compostos de defesa não específicos, pode promover o esgotamento do sistema imunológico (GILL; TSUNG; BILLIAR, 2010; ABRAM; DIXON; KATZENBACK, 2017). No entanto, o efeito individual dos prebióticos na dieta sobre o *burst* oxidativo neste experimento parece incompatível em relação aos padrões observados na tilápia do Nilo ou outras espécies de peixes. Estas inconsistências estão provavelmente relacionadas a um possível efeito adjuvante entre a MOS e  $\beta$ -glucanas ou as diferentes concentrações de prebióticos, em função do tempo de exposição à baixa temperatura da água.

Neste estudo, a função fagocitária melhorou após a suplementação dietética. O percentual de atividade de fagocitose foi significativamente maior nos tratamentos MOS e MOS +  $\beta$ -glucanas, enquanto a capacidade fagocitária, medida pelo índice fagocitário, incrementou com o MOS dietético. Ambos os parâmetros são de grande importância, o primeiro indica quantas células realizaram a fagocitose com sucesso, mostrando a eficiência celular geral, enquanto o segundo mostra o número de

partículas (patógenos) fagocitadas por cada uma das células, denotando a eficiência celular individual.

A suplementação dietética de MOS e  $\beta$ -glucanas a 0,3% melhorou a atividade fagocitária em *O. niloticus* após 30 dias de experimentação (SELIM; REDA, 2015), da mesma forma, Abu-Elala *et al.* (2018) relataram maior capacidade fagocitária em tilápia do Nilo suplementadas dieteticamente de com 0,2% de MOS e  $\beta$ -glucanas por 60 dias, também foi relatado que 1% de MOS adicionado à dieta por 30 dias, melhora a função fagocitária da tilápia do Nilo (DAWOOD *et al.*, 2020b). Em relação ao uso de  $\beta$ -glucanas dietéticas, ao incluí-las na concentração de 0,05% por 30 dias na alimentação da tilápia do Nilo, observou-se melhora da atividade fagocitária, mas não da capacidade fagocitária (DAWOOD *et al.*, 2020e), contrariamente, a suplementação com 0,05% de  $\beta$ -glucanas associada a um probiótico (0,005%) na dieta de tilápia do Nilo por 30 dias não modulou a função fagocitária (DAWOOD *et al.*, 2020a).

A atividade das células fagocíticas é limitada pelo estresse oxidativo (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2013), o qual é uma condição que se refere ao desequilíbrio entre os níveis de radicais livres e a produção de antioxidantes pelo organismo (BILLER; TAKAHASHI, 2018). O excesso de radicais livres pode danificar tecidos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (MACHOVÁ; BYSTRICKÝ, 2013; CHOWDHURY; SAIKIA, 2020), e a exposição prolongada a baixas temperaturas diminui o transporte de oxigênio para os tecidos, promovendo assim estresse oxidativo (ALVA; PALOMEQUE; CARBONELL, 2013).

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione redutase, glutathione-s-transferase, catalase e glutathione peroxidase podem eliminar ou neutralizar EROs (CHOWDHURY; SAIKIA, 2020). As expressões genicas relativas de catalase e glutathione peroxidase foram reguladas positivamente em tilápias do Nilo suplementadas dieteticamente com  $\beta$ -glucanas (DAWOOD *et al.*, 2020e) e com MOS (DAWOOD *et al.*, 2020b), mantendo o equilíbrio antioxidante após exposição a agentes tóxicos que promovem o estresse oxidativo, sugerindo assim, uma redução do dano celular e uma melhora do estado imunológico. A atividade antioxidante de mananas e glucanas de *S. cerevisiae* foi amplamente abordada por Machová e Bystrický (2013). No presente experimento, os prebióticos MOS e  $\beta$ -glucanas foram capazes de modular positivamente a resposta imune, provavelmente evitando o acúmulo excessivo de radicais livres por meio da regulação de enzimas antioxidantes

como a catalase e glutathione peroxidase, evitando quedas nas respostas do sistema imunológico na tentativa de evitar a produção de EROs.



## 6 CONCLUSÃO

A inclusão dietética dos prebióticos tem um impacto positivo na resposta imune e morfologia intestinal em tilápia do Nilo. A suplementação com 1,0% de MOS + 0,1% de  $\beta$ -glucanas em dietas de tilápia do Nilo sob baixa temperatura da água promove de forma eficiente o sistema imunológico inato, no entanto, a suplementação com 0,2% de MOS é a melhor estratégia para prevenir alterações fisiológicas causadas por longos períodos de baixa temperatura típica de regiões temperadas, pois promove o maior número de respostas imunes (concentração de lisozima no soro e muco, atividade fagocítica, índice fagocítico, altura das vilosidades) frente ao desafio da hipotermia em época inverno.

As estratégias nutricionais para a aquicultura de tilápia do Nilo estão bem adaptadas à faixa ótima de temperatura da água para criação, no entanto, as práticas nutricionais com baixa temperatura da água ainda requerem mais esforços para otimizar o equilíbrio dietético da tilápia ao longo do ano. Deve-se observar que a resposta imune no nível de campo provavelmente depende do tipo de desafio, e os experimentos de laboratório que fornecem informações sobre alguns aspectos individuais da imunidade podem não revelar a capacidade total dos indivíduos de lidar com desafios biológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-GHANY, H. M. *et al.* Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Thermal Biology**, v. 79, p. 50–55, 2019.
- ABRAM, Q. H.; DIXON, B.; KATZENBACK, B. A. Impacts of low temperature on the teleost immune system. **Biology**, v. 6, n. 4, p. 1–15, 2017.
- ABREU, J. *et al.* Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133–1139, nov. 2009.
- ABU-ELALA, N. M. *et al.* Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 4, p. 333–341, 2018.
- AKHTER, N. *et al.* Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 733–741, ago. 2015.
- AKTER, M. N. *et al.* Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. **Aquaculture International**, v. 24, n. 1, p. 127–144, 2016.
- ALCORN, S. W.; MURRAY, A. L.; PASCHO, R. J. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, n. 4, p. 303–334, 2002.
- ALVA, N.; PALOMEQUE, J.; CARBONELL, T. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: Can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 20–28, 2013.
- AMPHAN, S. *et al.* Feeding-regimen of  $\beta$ -glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 87, p. 120–128, 2019.
- AOAC (Association Of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th ed. Arlington: AOAC International, 2000.
- ARAUJO, D. de M. *et al.* Hematologia de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 294–302, 2011.
- ARAUJO, E. P. de *et al.* Dietary spray-dried plasma enhances the growth performance, villus: crypt ratio and cold-induced stress resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 479, n. July, p. 675–681, 2017.

BAGNI, M. *et al.* Short- and long-term effects of a dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, n. 4, p. 311–325, 2005.

BAN, M. Effects of Photoperiod and Water Temperature on Smoltification of Yearling Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Bulletin of the National Salmon**, n. 3, p. 25–28, 2000.

BARROS, M. M. *et al.* Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed  $\beta$ -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 39, n. 2, p. 188–195, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, J. *et al.* Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 2, p. 425–429, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish immunology. The modification and manipulation of the innate immune System: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 86, n. 3, p. 1483–1495, 2014.

BILLER, J. D.; TAKAHASHI, L. S. Oxidative stress and fish immune system: Phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 90, n. 4, p. 3403–3414, 2018.

BINDELS, L. B. *et al.* Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 5, p. 303–310, 2015.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, v. 5, n. 6, p. 771–781, 1973.

BOWYER, P. H. *et al.* Benefits of a commercial solid-state fermentation (SSF) product on growth performance, feed efficiency and gut morphology of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different UK lupin meal cultivars. **Aquaculture**, v. 523, n. September, 2020.

BOYD, C. E. *et al.* Certification issues for some common aquaculture species. **Reviews in Fisheries Science**, v. 13, n. 4, p. 231–279, 2005.

BURGOS-ACEVES, M. A.; LIONETTI, L.; FAGGIO, C. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. **Science of the Total Environment**, v. 670, p. 1170–1183, 2019.

BURR, G. *et al.* Effects of prebiotics on nutrient digestibility of a soybean-meal-based diet by red drum *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus). **Aquaculture Research**, v. 39, n. 15, p. 1680–1686, 2008.

CAI, W. Q.; LI, S. F.; MA, J. Y. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia x male

blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. **Aquaculture**, v. 229, n. 1–4, p. 79–87, 2004.

CAIPANG, C. M. A.; LAZADO, C. C. Nutritional impacts on fish mucosa: Immunostimulants, pre- and probiotics. In: BECK, B. H.; PEATMAN, E. (Ed.). **Mucosal Health in Aquaculture**. Oxford: Academic Press, p. 211–272. 2015.

CECHIM, F. E. *et al.* Dietary Mannanooligosaccharide Influenced Feed Consumption and Gut Morphology of Nile Tilapia Raised in Net-Cage Systems. **Boletim Do Instituto De Pesca**, v. 41, n. 3, p. 519–527, 2015.

CHAGAS, E. C. *et al.* Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração suplementada com  $\beta$ -glucano. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 899–905, 2013.

CHEE, S. H. *et al.* Functional interactions of manno-oligosaccharides with dietary threonine in chicken gastrointestinal tract. I. Growth performance and mucin dynamics. **British Poultry Science**, v. 51, n. 5, p. 658–666, 2010.

CHEN, X.-Q. *et al.* Effects of dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) on growth performance, immune response, antioxidant capacity and histomorphology of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 90, n. March, p. 30–39, 2019.

CHETTRI, J. K. *et al.* PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 4, p. 476–482, 2011.

CHOWDHURY, S.; SAIKIA, S. K. Oxidative Stress in Fish: A Review. **Journal of Scientific Research**, v. 12, n. 1, p. 145–160, 2020.

CORRÊA, C. F. *et al.* Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 497, n. March, p. 82–90, 2018.

CPTe (Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos). Climatologia de Temperatura Mínima e Máxima. **Estações do ano**. 2019. Disponível em: <http://clima1.cptec.inpe.br/estacoes/pt#>. Acesso em: 14 fev. 2021.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J.  $\beta$ -Glucans As Conductors of Immune Symphonies. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 384–396, 2008.

DAS, S.; MONDAL, K.; HAQUE, S. A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 52, p. 422–429, 2017.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* Dietary supplementation of  $\beta$ -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 148–159, 2017.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* Growth performance and hemato-immunological

responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to deltamethrin and fed immunobiotics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 11, p. 11608–11617, 2020a.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* The effect of mannanoligosaccharide on the growth performance, histopathology, and the expression of immune and antioxidative related genes in Nile tilapia reared under chlorpyrifos ambient toxicity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 103, n. May, p. 421–429, 2020b.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* The impact of menthol essential oil against inflammation, immunosuppression, and histopathological alterations induced by chlorpyrifos in Nile tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 102, n. March, p. 316–325, 2020c.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and  $\beta$ -Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 172–183, 2020d.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* The influence of dietary  $\beta$ -glucan on immune, transcriptomic, inflammatory and histopathology disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 98, n. January, p. 301–311, 2020e.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 454, p. 243–251, mar. 2016.

DAWOOD, M.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture : a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 950–974, 2018.

DE KIVIT, S. *et al.* Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: Implications for pro- and prebiotics. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. Feb, p. 1–7, 2014.

DIMITROGLOU, A. *et al.* The effect of mannan oligosaccharide supplementation on atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) fed diets with high levels of plant proteins. **Journal of Aquaculture Research and Development**, n. 1, 2011.

DONALDSON, M. R. *et al.* Cold shock and fish. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 7, p. 1491–1530, 2008.

DOS SANTOS, V. B.; MARECO, E. A.; SILVA, M. D. P. Curvas de crescimento de linhagens de tilapias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em diferentes temperaturas. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 35, n. 3, p. 235–242, 2013.

EBRAHIMI, G. *et al.* Effects of a prebiotic , Immunogen  $\hat{a}$  , on feed utilization , body composition , immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* ( Linnaeus ) fingerlings. v. 96, p. 591–599, 2012.

EL-SAYED, A.-F. M. **Intensive culture**. 2nd. ed. London: Academic Press, 2020.

- ELGENDY, M. Y. *et al.* Impacts of extreme cold water conditions and some bacterial infections on earthen-pond cultured Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 136–145, 2015.
- ENGELSMA, M. Y. *et al.* Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 15, n. 5, p. 397–410, 2003.
- FAGGIO, C. *et al.* Effect of storage time on haematological parameters in mullet, *Mugil cephalus*. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 5, p. 412–416, 2013.
- FALCON, D. R. *et al.* Physiological responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed vitamin C- and lipid-supplemented diets and submitted to low-temperature stress. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 287–295, 2007.
- FALCON, D. R. *et al.* Leucograma da Tilápia-do-Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 543–551, 2008.
- FAO (The Food and Agriculture Organization). **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)**. 2020. Disponível em: <https://www.doi.org/10.4060/ca9229es>. Acesso em: 6 jan. 2021
- FAO (The Food and Agriculture Organization). **Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Branch 2021 (FishStatJ-2021)**. Disponível em: <http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector>. Acesso em: 6 jan. 2021
- FAZIO, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 500, p. 237–242, 2019.
- FERNANDES, C. A. J. *et al.* Resposta hemática de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1619–1625, 2010.
- FONSECA, J. R. S. *et al.* Effects of bac-trat® probiotic complex on growth, hematological and intestinal parameters of Nile tilapia, reared at low temperatures\*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 46, n. 2, p. 1–10, 2020.
- GARCIA, F.; SANTOS, V. B.; MORAES, E. Eficiência da suplementação alimentar em tilápias do nilo usando modelo exponencial de crescimento efficiency. **Arch. Zootec**, v. 60, n. 232, p. 1239–1246, 2011.
- GILL, R.; TSUNG, A.; BILLIAR, T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 9, p. 1121–1132, 2010.
- GOLDENFARB, P. B. *et al.* Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American journal of clinical pathology**, v. 56, n. 1, p. 35–39, 1971.

GRANT, K. R. Fish Hematology and Associated Disorders. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 3, p. 681–701, 2015.

GUARDIOLA, F. A. *et al.* Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, p. 545–551, 2014.

HA, N. *et al.* Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation. **Aquaculture International**, v. 25, n. 2, p. 755–776, 2017.

HASSAAN, M. S. *et al.* Nutritional mitigation of winter thermal stress in Nile tilapia by propolis-extract: Associated indicators of nutritional status, physiological responses and transcriptional response of delta-9-desaturase gene. **Aquaculture**, v. 511, n. June, p. 734256, 2019.

HASSAN, B. *et al.* Environmental isotonicity improves cold tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 1, p. 59–65, 2013.

HAYWARD, C. J.; BOTT, N. J.; NOWAK, B. F. Seasonal epizootics of sea lice, *Caligus* spp., on southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau), in a long-term farming trial. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 1, p. 101–106, 2009.

HE, Y. fu *et al.* Effects of salinity on cold tolerance of Malaysian red tilapia. **Aquaculture International**, v. 25, n. 2, p. 777–792, 2017.

HISANO, H. *et al.* Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: Aspectos hematológicos e histológicos. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 311–318, 2006.

HISANO, H. *et al.* Influence of yeast and yeast derivatives on growth *Macrobrachium amazonicum*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 657–662, 2008.

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

HOSEINIFAR, S. H. *et al.* Probiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 23, n. 4, p. 315–328, 2015.

HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 29, n. 1, p. 7–12, 2000.

JEONG, J.-W.; KIM, Y.-S.; KANG, J.-C. Combined effects of temperature and arsenic on hematological parameters of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of fish pathology**, v. 25, n. 1, p. 39–46, 2012.

KAWAHARA, E.; UEDA, T.; NOMURA, S. *In Vitro* Phagocytic Activity of White-Spotted Char Blood Cells after Injection with *Aeromonas salmonicida* Extracellular Products. **Fish Pathology**, v. 26, n. 4, p. 213–214, 1991.

KEFAS, M.; ABUBAKAR, K. A.; JA'AFARU, A. Haematological indices of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 3, n. 1, p. 9–14, 2015.

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.

KOCH, J. F. *et al.* Revista Brasileira de Zootecnia Levedura como pronutriente em dietas para matrizes e alevinos de tilápia- Yeast as pro-nutrient in diets for Nile tilapia broodstock females and fingerlings O sistema intensivo de produção de larvas e alevinos A pesquisa fo. p. 2281–2289, 2011.

KORTET, R.; VAINIKKA, A. Seasonality of Innate Immunity; Evolutionary Aspects and Latest Updates. In: DURAND, M.; MOREL, C. V (Ed.). **New Research on Innate Immunity**. p. 13–45. 2008.

KOSHIO, S. Immunotherapies targeting fish mucosal immunity - Current knowledge and future perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 15–18, 2016.

KÜHLWEIN, H. *et al.* Effects of dietary  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 279–289, 2014.

KUMARI, J. *et al.* Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. **Aquaculture**, v. 252, n. 2–4, p. 121–127, 2006.

LAM, K. L.; CHI-KEUNG CHEUNG, P. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, n. 1, p. 45–64, 2013.

LEE, S. *et al.* Synergistic effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* WB60 and mannanoligosaccharide (MOS) on growth performance, immunity and disease resistance in *Japanese eel*, *Anguilla japonica*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 83, n. May, p. 283–291, 2018.

LEVY-PEREIRA, N. *et al.* Immunostimulation and increase of intestinal lactic acid bacteria with dietary mannan-oligosaccharide in Nile tilapia juveniles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, 2018.

LIE, Ø. *et al.* Study on lysozyme activity in some fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 6, n. February, p. 1–5, 1989.

LIMA DE ALMEIDA, C. A. *et al.* Effect of the dietary linoleic/ $\alpha$ -linolenic ratio (n6/n3) on histopathological alterations caused by suboptimal temperature in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Thermal Biology**, v. 85, n. May, p. 1–10, 2019.



LIN, S. *et al.* Effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 788–794, 2011.

MA, X. Y. *et al.* Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 937–950, 2015.

MACHOVÁ, E.; BYSTRICKÝ, S. Antioxidant capacities of mannans and glucans are related to their susceptibility of free radical degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 308–311, 2013.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137–151, 2006.

MAGOUZ, F. I. *et al.* Impact of biomas and Agrimos dietary supplementation on growth performance, feed utilization and immunological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Slovenian Veterinary Research**, v. 56, n. Suppl 22, p. 87–98, 2019.

MAGOUZ, F. I. *et al.* The role of a digestive enhancer in improving the growth performance, digestive enzymes activity, and health condition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 526, n. March, p. 735388, 2020.

MARTINS, M. L. *et al.* Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes : Cichlidae) Submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Inst.Pesca**, v. 30, n. 1, p. 71–80, 2004.

MARTINS, M. L. *et al.* Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 774–780, 2011.

MCANDREW, B. J. *et al.* Tilapia genomic studies. In: MACKENZIE, S.; JENTOFT, S. (Ed.). **Genomics in Aquaculture**. London: Academic Press, 2016. p. 105–129.

MILSTEIN, A. *et al.* Low temperature tolerance of pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 58, n. 4, p. 455–460, 2000.

MONTALBAN-ARQUES, A. *et al.* Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. OCT, p. 1–14, 2015.

MOURA, G. de S. *et al.* Desempenho e atividade de amilase em tilápias-do-nilo submetidas a diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1609–1615, 2007.

- MOUSTAFA, E. M. *et al.* Modulatory effects of fenugreek seeds powder on the histopathology, oxidative status, and immune related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 515, n. October, p. 734589, 2020.
- NÁJERA-ARZOLA, I. C. *et al.* Evaluation of Mannan oligosaccharides (MOS) in balanced diets for tropical gar juveniles (*Atractosteus tropicus*). **Hidrobiologica**, v. 28, n. 3, p. 239–246, 2018.
- NAWAZ, A. *et al.* The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 76, n. February, p. 272–278, 2018.
- NIELSEN, M. E.; ESTEVE-GASSENT, M. D. The eel immune system: Present knowledge and the need for research. **Journal of Fish Diseases**, v. 29, n. 2, p. 65–78, 2006.
- NOBREGA, R. O. *et al.* Improving winter production of Nile tilapia: What can be done? **Aquaculture Reports**, v. 18, 2020.
- PASCOLI, F. *et al.* Seasonal effects on hematological and innate immune parameters in sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 1081–1087, 2011.
- PAZ, A. de L. *et al.* Protective effects of the fructooligosaccharide on the growth performance, hematology, immunology indicators and survival of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Serrasalminidae) infected by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 15, n. August, p. 100222, 2019.
- PEIXE-BR. Anuário Peixe Br da Piscicultura 2020. **Associação Brasileira de Piscicultura**, p. 1–136, 2020.
- PILARSKI, F. *et al.* Different  $\beta$ -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 25–29, 2017.
- PRESS, C. M. Immunology of Fishes. In: PASTORET, P. P. *et al.* (Ed.). **Handbook of Vertebrate Immunology**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 3–62.
- RAN, C. *et al.* A comparison of the beneficial effects of live and heat-inactivated baker's yeast on Nile tilapia: Suggestions on the role and function of the secretory metabolites released from the yeast. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–16, 2015.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. *et al.* **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Eduem, 2013.
- ŘEHULKA, J.; ADAMEC, V. Red blood cell indices for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) reared in cage and raceway culture. **Acta Veterinaria Brno**, v. 73, n. 1, p. 105–114, 2004.
- RINGØ, E. *et al.* Prebiotics in aquaculture: A review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n.

2, p. 117–136, 2010.

RINGØ, E. *et al.* Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 24, n. 4, p. 1005–1032, 2014.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed.). **Membrane lipid oxidation**. 1 ed. Boca Raton, CRC Press, 1991. p. 151-70,

SADO, R. *et al.* Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). **Latin american journal of aquatic research**, v. 43, n. 5, p. 944–952, 2015.

SADO, R. Y. *et al.* Hematología de juveniles de pacu , *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg , 1887) alimentado con raciones suplidas con manan oligosacáridos (MOS). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 1, p. 30–39, 2014.

SADO, R. Y.; BICUDO, Á. J. A.; CYRINO, J. E. P. Growth and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed dietary prebiotics (mannanoligosaccharides-MOS). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1517–1524, 2014.

SADO, R. Y.; BICUDO, Á. J. D. A.; CYRINO, J. E. P. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, p. 821–826, 2008.

SALAH, A. S.; EL NAHAS, A. F.; MAHMOUD, S. Modulatory effect of different doses of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 204–213, 2017.

SALZE, G. *et al.* Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 148–152, 2008.

SANCHEZ, J. *et al.* Effect of  $\beta$  glucan dietary levels on immune response and hematology of channel catfish *Ictalurus punctatus* juveniles. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 4, p. 690–698, 2017.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme : an important defence molecule of fish innate immune system. p. 223–239, 2008.

SCHMIDT, J. *et al.* Effect of Beta-1-3-Glucan and Mannans on Growth and Fitness of Starry Flounder (*Platichthys Stellatus*): A Potential New Candidate for Aquaculture in Temperate Regions. **Journal of FisheriesSciences.com**, v. 11, n. 3, p. 17–25, 2017.

SELIM, K. M.; REDA, R. M. Beta-Glucans and Mannan Oligosaccharides Enhance Growth and Immunity in Nile Tilapia. **North American Journal of Aquaculture**, v. 77, n. 1, p. 22–30, 2015.

- SHELBY, R. A. *et al.* Effects of yeast oligosaccharide diet supplements on growth and disease resistance in Juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 21, n. 1, p. 61–71, 2009.
- SIDDIK, M. A. B. *et al.* Over-wintering growth performance of *Oreochromis niloticus*. **Croatian Journal of Fisheries**, n. 72, p. 70–76, 2014.
- SOARES, M. P. *et al.* Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 73, n. November 2017, p. 133–140, 2018.
- SONG, S. K. *et al.* Probiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 40–48, 2014.
- STECKERT, L. D. *et al.* Hematological analysis and relative condition factor in naturally parasitized Nile tilapia. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 47, n. 3, p. 502–512, 2019.
- SUBBOTKINA, T. A.; SUBBOTKIN, M. F. Lysozyme content in organs and blood serum in various species in the Volga river. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 5, p. 537–546, 2003.
- SUNDH, H.; SUNDELL, K. S. Environmental impacts on fish mucosa. In: BECK, B. H.; PEATMAN, E. (Ed.). **Mucosal Health in Aquaculture**. Oxford: Academic Press, 2015. p. 171–198.
- TAOKA, Y. *et al.* Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v. 72, n. 4, p. 755–766, 2006.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Hematologia: Ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN NETO, A.; MARIANO, W. DOS S.; SÓRIA, S. F. (Ed.). **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009. p. 43–80.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. De. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Biosci J**, v. 19, n. 1, p. 107–114, 2003.
- The Nelson Institute Center for Sustainability and the Global Environment. Atlas of the Biosphere. University of Wisconsin-Madison. Disponível em: <https://nelson.wisc.edu/sage/data-and-models/atlas/maps.php?datasetid=35&includerelatedlinks=1&dataset=35>. Acesso em: 6 jan. 2021
- THOMPSON, M. *et al.* A dietary dairy/yeast probiotic and flaxseed oil enhance growth, hematological and immunological parameters in channel catfish at a suboptimal temperature (15°C). **Animal**, v. 9, n. 7, p. 1113–1119, 2015.
- TORRECILLAS, S. *et al.* Effects of dietary concentrated mannan oligosaccharides

supplementation on growth, gut mucosal immune system and liver lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 42, n. 2, p. 508–516, 2015a.

TORRECILLAS, S. *et al.* Dietary mannan oligosaccharides: Counteracting the side effects of soybean oil inclusion on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gut health? **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUL, p. 1–15, 2015b.

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

URIBE, C. *et al.* Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486–503, 2011.

VALLADÃO, G. M.; GALLANI, S.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 351–369, 2018.

VAN MUISWINKEL, W. B.; VERVOORN-VAN DER WAL, B. The Immune System of Fish. In: WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections**. 2nd. ed. Wallingford: CABI, 2006. p. 678–701.

VELMURUGAN, B. K.; CHAN, C. R.; WENG, C. F. Innate-immune responses of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposure to acute cold stress. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 9, p. 16125–16135, 2019.

VIEIRA DE AZEVEDO, R. *et al.* Effects of dietary mannan oligosaccharide on the growth, survival, intestinal morphometry and nonspecific immune response for Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) larvae. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 4, p. 800–806, 2016.

WANG, W. *et al.* Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. **Aquaculture Research**, n. 48, p. 1–23, 2017.

WELKER, T. L. *et al.* Use of Diet Crossover to Determine the Effects of  $\beta$ -glucan Supplementation on Immunity and Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 3, p. 335–348, 2012.

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

WU, F. *et al.* Improving low-temperature stress tolerance of tilapia, *Oreochromis niloticus*: A functional analysis of *Astragalus membranaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 4, p. 749–762, 2019.

XU, Y.; ZHENG, Y.; DING, Z. Research progress on the effects, mechanisms, and control of cold stress in aquatic animals. **Journal of Fishery Sciences of China**, v. 24, n. 5, p. 1149–1159, 2017.

ZHAO, H. *et al.* Impact of feed additives on surface mucosal health and columnaris

susceptibility in channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 2, p. 624–637, 2015.