



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Lúvia Souza de Sá

Desempenho zootécnico e modulação do estado de saúde de juvenis de tilápia-do-Nilo suplementados com uma mistura funcional de imunomoduladores contendo β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol

Florianópolis

2024

Lúvia Souza de Sá

Desempenho zootécnico e modulação do estado de saúde de juvenis de tilápia-do-Nilo suplementados com uma mistura funcional de imunomoduladores contendo β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura e Recursos Pesqueiros.
Orientador: Prof. José Luiz Pedreira Mouriño Dr.

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Sá, Lúvia Souza de
Desempenho zootécnico e modulação do estado de saúde de juvenis de tilápia-do-Nilo suplementados com uma mistura funcional de imunomoduladores contendo β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol / Lúvia Souza de Sá ; orientador, José Luiz Pedreira Mouriño, 2024.
66 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Piscicultura. 3. Aquicultura Intensiva. 4. Imunomodulador. 5. Aditivos Alimentares. I. Mouriño, José Luiz Pedreira . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Lúvia Souza de Sá

Desempenho zootécnico e modulação do estado de saúde de juvenis de tilápia-do-Nilo suplementados com uma mistura funcional de imunomoduladores contendo β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 25 de abril de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, Dr
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Aline Brum, Figueredo Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Cristiane Fátima Meldau de Campos Amaral, Dra.
Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul

Profa. Lis Santos Marques, Dra
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Aquicultura e Recursos Pesqueiros.

Prof. Claudio Manoel Rodrigues De Melo, Dr.
Coordenador do Programa

Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho a Deus, e à minha amada família, que, como verdadeiros anjos em minha vida, nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a diversas pessoas e instituições que desempenharam papéis fundamentais em minha jornada até aqui:

Aos meus pais e à minha irmã, que sempre me apoiaram de maneira inestimável, fornecendo suporte emocional, conhecimento e assistência prática.

Ao meu orientador, Professor José Luiz Pedreira Mouriño, expresso minha gratidão pelas oportunidades que me proporcionou, pela confiança, apoio e inspiração para me tornar um profissional e ser humano melhor a cada dia.

Ao Professor Maurício Laterça Martins, agradeço por toda a assistência, explicações e sugestões valiosas durante a realização do experimento e análises.

À empresa DSM, que forneceu suporte financeiro para a execução do projeto, e em especial ao Sr. Tiago Soligo, pelo seu contínuo apoio e contribuições.

Aos membros da banca examinadora, agradeço a participação e pelas valiosas contribuições.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, pelos ensinamentos ao longo do curso.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Carlito Klunk, pela assistência valiosa e atenção prestada em diversas ocasiões.

A todos os amigos do Laboratório AQUOS, que ofereceram ajuda essencial durante a execução deste projeto, além de momentos de alegria e descontração.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização e construção deste trabalho, envio meus sinceros agradecimentos.

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

RESUMO

A intensificação da produção aquícola sem um manejo adequado pode tornar os peixes susceptíveis ao aparecimento de doenças. Dessa forma, compreender os impactos de uma nutrição adequada na imunidade é importante para melhorar a saúde e parâmetros zootécnicos destes animais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de uma mistura funcional de imunomoduladores composta por β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico (vitamina C) e alfa-tocoferol (vitamina E), associada a uma dieta com substituição parcial da proteína animal por proteína de origem vegetal, com menores níveis de inclusão de proteína animal (11,5%) e maiores em farelo de soja (43,5%). Duas dietas isocalóricas e isoproteicas (35% de proteína bruta) foram formuladas, uma com a inclusão da mistura funcional imunomodulador (40 kg.t^{-1}) na dieta, composta por 150 mg.kg^{-1} de nucleotídeos, 1000 mg.kg^{-1} de β -glucanos, 1000 mg.kg^{-1} de ácido ascórbico (vitamina C) e 20 mg.kg^{-1} de alfa-tocoferol (vitamina E), e outra sem a inclusão. Em um primeiro momento, o objetivo foi avaliar o efeito da suplementação com a mistura funcional no desempenho zootécnico, histologia do fígado, baço e intestino, morfologia intestinal e composição centesimal de juvenis de tilápia-do-nilo após 50 dias de suplementação. Para isso, ao final do período experimental, foram analisados índices zootécnicos, composição corporal dos peixes e histologia (intestinal, hepática e esplênica). Os dados foram submetidos à análise de teste t, ao nível de significância de 5% para todos os testes. A suplementação resultou em aumento de 59,95% no peso final, ganho de peso de 64%, ganho diário de 66%, e diminuição de 21,31% na taxa de conversão alimentar e dobrou a retenção de proteína corporal em juvenis de tilápia-do-nilo em comparação com os peixes que receberam a dieta controle. A suplementação com a mistura funcional imunomoduladora melhorou a morfologia intestinal, o que sugere o aumento da absorção de nutrientes, o que contribui para o melhor desempenho zootécnico do grupo com a dieta suplementada. Na segunda etapa da pesquisa, o efeito da inclusão da mistura funcional imunoestimulante foi verificada através dos parâmetros hematológicos, imunológicos, saúde e microbioma intestinal de juvenis após 50 dias de suplementação. Ademais, a microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para avaliar a integridade das microvilosidades e das células intestinais. Os dados das análises hemato-imunológicas foram submetidos à análise de teste t, considerando um nível de significância de 5%. Para estimar a riqueza e a diversidade bacteriana nos períodos amostrados, foi realizada uma análise de rarefação α , os índices Cobertura de Sequenciamento, Chao1 e Shannon, através da ferramenta “alpha_diversity.py”. A suplementação combinada de nucleotídeos, β -glucanos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol foi capaz de modular o microbioma intestinal, aumentando a diversidade Chao-1. A microscopia eletrônica de transmissão confirmou que os peixes alimentados com ambas as dietas apresentaram membranas mucosas intestinais intactas. A suplementação não alterou os parâmetros hematológicos e imunológicos dos peixes, indicando um reforço na saúde sem estresse imunológico. Portanto, a suplementação com nucleotídeos, β -glucanos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol em juvenis de tilápia-do-nilo é uma estratégia eficaz para potencializar o desempenho e a saúde de juvenis de tilápia-do-nilo, promovendo um crescimento saudável sem comprometer o sistema imunológico.

Palavras-chave: Aquicultura, Piscicultura, Aquicultura Intensiva, Imunomodulador, Aditivos Alimentares.

ABSTRACT

The intensification of aquaculture production without proper management can make fish susceptible to the emergence of diseases. Therefore, understanding the impacts of adequate nutrition on immunity is important for improving the health and zootechnical parameters of these animals. The aim of this study was to evaluate the effect of supplementing a functional mixture of immunomodulators composed of β -glucans, nucleotides, ascorbic acid, and alpha-tocopherol, associated with a diet partially replacing animal protein with plant-origin protein, with lower levels of animal protein inclusion (11.5%) and higher levels of soybean meal (43.5%). Two isocaloric and isoproteic diets (35% crude protein) were formulated, one with the inclusion of the immunomodulator functional mixture (40 kg.t^{-1}) in the diet, composed of 150 mg.kg^{-1} of nucleotides, 1000 mg.kg^{-1} of β -glucans, 1000 mg.kg^{-1} of ascorbic acid, and 20 mg.kg^{-1} of alpha-tocopherol, and another without the inclusion. Initially, the objective was to evaluate the effect of supplementation with the functional mixture on zootechnical performance, liver, spleen, and intestinal histology, intestinal morphology, and proximate composition of Nile tilapia juveniles after 50 days of supplementation. For this, at the end of the experimental period, zootechnical indices, fish body composition, and histology (intestinal, hepatic, and splenic) were analyzed. Data were subjected to t-test analysis, at a significance level of 5% for all tests. Supplementation resulted in a 59.95% increase in final weight, 64% weight gain, 66% daily gain, and a 21.31% decrease in feed conversion rate, and doubled body protein retention in Nile tilapia juveniles compared to fish that received the control diet. Supplementation with the immunomodulator functional mixture improved intestinal morphology, suggesting increased nutrient absorption, contributing to better zootechnical performance in the supplemented diet group. In the second stage of the research, the effect of including the immunostimulant functional mixture was verified through hematological, immunological, health, and intestinal microbiome parameters of juveniles after 50 days of supplementation. Furthermore, transmission electron microscopy was used to evaluate the integrity of intestinal microvilli and cells. Hemato-immunological analysis data were subjected to t-test analysis, considering a significance level of 5%. To estimate bacterial richness and diversity in the sampled periods, an α -rarefaction analysis was performed, the Sequencing Coverage, Chao1, and Shannon indices, through the "alpha_diversity.py" tool. The supplementation was able to modulate the intestinal microbiome, increasing Chao-1 diversity. Transmission electron microscopy confirmed that fish fed both diets had intact intestinal mucosal membranes. Supplementation did not alter the hematological and immunological parameters of the fish, indicating reinforcement in health without immunological stress. Supplementation with nucleotides, β -glucans, ascorbic acid, and alpha-tocopherol in Nile tilapia juveniles is an effective strategy to enhance the performance and health of Nile tilapia juveniles, promoting healthy growth without compromising the immune system.

Keywords: Aquaculture, Fish farming, Intensive Aquaculture, Immunomodulator, Food Additives.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1	Enfermidades	10
1.2	Imunomoduladores	12
1.2.1	β-glucanos	13
1.2.2	Vitaminas C e E.....	15
1.2.3	Nucleotídeos.....	16
1.3	Objetivos.....	19
1.3.1	Objetivo Geral.....	19
1.3.2	Objetivos Específicos.....	19
	CAPÍTULO I: Mistura funcional de imunomoduladores associada à dieta com alta inclusão de farelo de soja e baixa inclusão de proteína animal melhora índices de desempenho zootécnico e morfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo (<i>O. niloticus</i>).....	20
1.	INTRODUÇÃO	22
2.	MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1	DIETA EXPERIMENTAL.....	23
2.2	PEIXES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	24
2.3	DESEMPENHO ZOOTECNICO E SOBREVIVÊNCIA	25
2.4	ANÁLISE PROXIMAL	26
2.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA	26
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
3.	RESULTADOS.....	27
3.1	DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E SOBREVIVÊNCIA	27
3.2	ANÁLISE PROXIMAL	28
3.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA	29
4	DISCUSSÃO.....	30
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34
	CAPÍTULO II: Efeito da suplementação com β-glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol associada à dieta com alta inclusão de farelo de soja sobre os parâmetros hemato-imunológicos e microbioma intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo	40

1	INTRODUÇÃO	42
2.	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	DIETA EXPERIMENTAL.....	43
2.2	PEIXES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	45
2.3	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	45
2.4	PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS	46
2.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	47
2.6	ANÁLISE DE METAGENÔMICA.....	47
2.6.1	Coleta das amostras	47
2.6.2	Extração de DNA	47
2.6.3	Amplificação da PCR	48
2.6.4	Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR)	48
2.6.5	Análise bioinformática e estatística	48
3.	RESULTADOS	49
3.1	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS.....	49
3.2	MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÔNICA (TEM)	49
3.4	ANÁLISE METAGENÔMICA.....	50
4	DISCUSSÃO	53
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
4.	CONCLUSÃO GERAL	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	62

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em 2050, espera-se que a população mundial atinja a marca de 9,5 bilhões, o que exigirá um aumento de 250 a 300 milhões de toneladas na produção de proteína animal para atender à demanda global por proteína de alta qualidade (TACON; METIAN; MCNEVIN, 2022). A aquicultura será um dos principais recursos para fornecer aos seres humanos uma fonte adequada de proteína animal oriunda de pescado, sendo necessária a adoção de estratégias ecologicamente sustentáveis (DAWOOD et al., 2020; KHANJANI et al., 2023).

Nesse contexto, a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais importantes para a aquicultura. Esta espécie adapta-se facilmente a diferentes condições ambientais e alimentares, sendo um peixe de crescimento rápido e altamente produtivo (KHANJANI; SHARIFINIA; HAJIREZAEI, 2022). No entanto, a aquicultura intensiva, na qual os animais são criados em altas densidades, pode potencialmente aumentar a propagação de patógenos e a frequência de surtos de doenças em animais estressados e imunossuprimidos (KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021).

Os alimentos funcionais são um novo padrão emergente para desenvolver dietas para peixes e crustáceos (ENCARNAÇÃO, 2015), incentivando a utilização de compostos imunomoduladores como estratégias preventivas para limitar e/ou controlar as doenças dos peixes (DIMITROGLOU et al., 2011). Entre os compostos imunomoduladores, destacam-se aditivos alimentares como β -glucanos e nucleotídeos, que são adicionados em dietas funcionais, a fim de melhorar a imunidade (ARAMLI; KAMANGAR; NAZARI, 2015; CORNET et al., 2021) e o desempenho zootécnico dos animais (DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2017; RINGØ et al., 2011).

1.1 ENFERMIDADES

Apesar do constante crescimento da atividade aquícola no Brasil e no mundo, dos avanços tecnológicos e desenvolvimento de novos sistemas de criação, as perdas durante o ciclo produtivo ainda são significativas, sendo as doenças infecciosas as principais causas de perda econômica na aquicultura mundial. Doenças resultam da interação complexa entre hospedeiro, patógeno e meio ambiente. O sistema de produção intensivo pode levar a condições ambientais na unidade de produção que podem estressar os animais, consequentemente ocorre aumento da suscetibilidade à infecção por patógenos que podem levar à doença. Assim, as condições que

promovem doenças são mais prevalentes nos sistemas de produção aquícola do que no ambiente natural (TUCKER; HARGREAVES, 2008). Dentre esses fatores estressantes estão a alta densidade de estocagem; variação da qualidade de água; e deficiências nutricionais (TUCKER; HARGREAVES, 2008; TAYLOR; HEDRICK, 2011).

Neste contexto a expansão da tilapicultura, está cada vez mais ameaçada por doenças, o que resulta em graves perdas financeiras devido à alta mortalidade (YI et al., 2019). A estreptococose é considerada a mais grave entre as doenças bacterianas que acometem a tilápia em todo o mundo, e a espécie *Streptococcus agalactiae*, tornou-se o principal patógeno da tilápia na última década (YANG et al., 2018; IREGUI et al., 2016). Após os primeiros relatos nos Estados Unidos em 1966 (ROBINSON; MEYER, 1966), a bactéria *S. agalactiae* já foi relatada em peixes no mundo todo (AMAL; SAAD, 2011; ASENCIOS et al., 2016; SALVADOR et al., 2003). A *S. agalactiae* é um microrganismo com formato de coccus, organizado em pares ou cadeias curtas, catalase negativa e oxidase positiva; pode ser α -, β - ou não-hemolítica (ASENCIOS et al., 2016; BULLER, 2004).

A principal porta de entrada de *S. agalactiae* para a tilápia-do-nilo da linhagem GIFT, é o epitélio gastrointestinal e dentre os sinais clínicos estão: a pericardite e peritonite fibrinosa; hemorragias ao redor do cérebro; região retrobulbar e intestino, o que resulta em consequências graves (IREGUI et al., 2016). Além disso, a meningite é uma manifestação clínica característica da tilápia-do-nilo infectada com *S. agalactiae*. (IREGUI et al., 2016; YI et al., 2019). Peixes infectados com *S. agalactiae* frequentemente apresentam desordens neurológicas, como natação constante e aberrante; exoftalmia e opacidade corneana; alterações patológicas na congestão meníngea; e infiltração de granulócitos. Até o momento, o mecanismo de dano ao sistema nervoso central da tilápia causado por *S. agalactiae* permanece obscuro (YI et al., 2019).

Por muito tempo, os antibióticos foram frequentemente usados na indústria aquícola para prevenir, controlar doenças infecciosas causadas por patógenos bacterianos e como promotores de crescimento (CARBONE; FAGGIO, 2016; DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2017). Atualmente, na China, são utilizados antibióticos e desinfetantes para prevenir e tratar a estreptococose em tilápias (ZHANG et al., 2019).

Entretanto, sabe-se que o uso indiscriminado de antibióticos é apontado como responsável por gerar riscos significativos para saúde pública, promovendo a seleção, propagação e persistência de cepas resistentes aos antibióticos (MOURIÑO et al., 2011), além da possível bioacumulação no músculo que pode afetar negativamente a saúde do consumidor (D'ABRAMO, 2018). A este respeito, em 2006, a União Europeia proibiu o uso de antibióticos

como promotores de crescimento na produção animal. Essa medida representou um avanço significativo na eliminação progressiva dos antibióticos utilizados para fins não medicinais (CARNEVALI; MARADONNA; GIOACCHINI, 2017).

Diante deste cenário, novas estratégias profiláticas e terapêuticas vêm sendo desenvolvidas para controlar a infecção por *S. agalactiae* e para prevenir surtos de estreptococose. Entre elas, o uso de vacinas está se tornando a estratégia mais importante para a prevenção de doenças estreptocócicas. Por representar papel central no crescimento e saúde animal, a nutrição também recebe importante atenção como ferramenta de prevenção às doenças bacterianas, principalmente através do uso de imunomodulador nas dietas.

1.2 IMUNOMODULADORES

Na formulação de dietas para aquicultura há demanda por ingredientes que, além de suprirem as exigências nutricionais das espécies, tenham ativa participação na manutenção do sistema imunológico (ENCARNAÇÃO, 2016). Assim, a capacidade de conferir naturalmente resistência a doenças através da nutrição é uma alternativa ao uso contínuo de níveis subterapêuticos de antibióticos para gerenciar a incidência de patógenos (D'ABRAMO, 2018). Nesse contexto, destaca-se o uso dos aditivos alimentares, a fim de manter a saúde e bem-estar dos peixes e melhorar o desempenho zootécnico (CARBONE; FAGGIO, 2016).

A utilização de aditivos na aquicultura, principalmente na piscicultura continental, tem mostrado resultados satisfatórios (KIRON, 2012). Os aditivos para rações aquáticas podem contribuir positivamente para o meio ambiente e sustentabilidade econômica que são fundamentais para o aumento global da produção aquícola, especialmente nos sistemas de produção intensivos (ENCARNAÇÃO, 2016).

Segunda a Instrução Normativa 30/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entende-se por aditivo uma substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios, atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano (BRASIL, 2009).

Dentre os aditivos para rações, destaca-se o uso dos aglutinantes, antioxidantes e conservantes de rações (compostos antifúngicos e antimicrobianos). As enzimas são usadas para melhorar a disponibilidade de certos nutrientes (proteases, amilases etc.) ou para diminuir o prejuízo pela presença de certos antinutrientes (enzimas fitase, polissacáridos não polares).

Outros aditivos são usados para melhorar o desempenho e a saúde dos animais assim como para gerenciar a microbiota intestinal (ENCARNAÇÃO, 2015).

Existem vários aditivos alimentares disponíveis para gerenciar e regular o microbioma a microbiota intestinal do peixe, incluindo o uso de probióticos, prebióticos, imunomoduladores, substâncias fitogênicas e ácidos orgânicos (ENCARNAÇÃO, 2015). Muitos imunomoduladores têm sido usados em peixes para induzir proteção contra uma ampla gama de doenças (VETVICKA; VANNUCCI; SIMA, 2013). Os imunomoduladores são uma importante estratégia na aquicultura para superar os efeitos imunossupressores causados pelos patógenos ou estresse causado pela alta densidade de estocagem.

Um imunomodulador pode ser definido como uma substância que melhora o sistema imunológico interagindo diretamente com células do sistema, levando a ativação de macrófagos, aumento da fagocitose por neutrófilos e monócitos, aumento do número de linfócitos, aumento da imunoglobulina sérica, e aumento da lisozima (SAKAI, 1999).

Estudos sobre nutrição de peixes, mostraram-se importantes não só para quantificar as necessidades de nutrientes para maximizar o crescimento do animal, mas também para entender o papel dos nutrientes na prevenção de doenças e a interação entre esses nutrientes.

De acordo com Shiau e Lin (2015), além do ácido ascórbico (vitamina C) e tocoferol (vitamina E), outras sete vitaminas demonstraram afetar as respostas imunes e/ou a resistência a doenças em peixes, como a: vitamina A, vitamina D, tiamina, B6, ácido fólico, ácido pantotênico e mioinositol (DELUCA, 2001; THOMPSON et al., 1995). Adicionalmente, os minerais são responsáveis pela formação do esqueleto, regulação do equilíbrio ácido-base e por muitos compostos biologicamente importantes, como hormônios e enzimas (WATANABE, 1997).

Na aquicultura, imunomoduladores inespecíficos têm sido amplamente utilizados, provavelmente devido ao conhecimento limitado da resposta imune em peixe e à facilidade de sua aplicação (VALLEJOS-VIDAL et al., 2016). Podemos destacar o efeito imunomodulador dos minerais, β -glucanos, nucleotídeos, vitamina C e vitamina E.

1.2.1 β -glucanos

Os efeitos dos β -glucanos na dieta têm sido investigados em peixes (HOSSAIN; KOSHIO; KESTEMONT, 2020; RODRIGUES et al., 2020), sendo este o imunomodulador mais utilizados na aquicultura. Os β -glucanos são carboidratos constituídos por moléculas de glicose, que são os principais componentes estruturais das paredes celulares de fungos,

bactérias, plantas e algas (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008). Esses compostos possuem diferenças nos pesos moleculares e no grau de ramificação, dependendo de sua fonte (DALMO; BØGWALD, 2008; VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008). Esses polissacáridos são reconhecidos pelo sistema imunológico de diferentes espécies de vertebrados, e são capazes também de promover a manutenção de um intestino mais saudável devido aos seus efeitos prebióticos.

Os β -glucanos influenciam o sistema imunológico inato dos organismos, conseqüentemente, promovendo o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2017; MEENA et al., 2013). O reconhecimento dos PAMPs pelas células do hospedeiro pode desencadear uma cascata inflamatória (DALMO; BØGWALD, 2008), aumentando assim a sua capacidade de combater os agentes patogênicos (RINGØ; SONG, 2016).

Um estudo realizado por Machuca et al. (2022), concluiu que a suplementação alimentar com β -glucanos para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) levou a alterações significativas na composição do microbioma intestinal. A microbiota intestinal desempenha papel crítico no bem-estar geral dos peixes. Mugwanya et al. (2022) relataram que os β -glucanos além de possuir efeitos prebióticos, estimulando a proliferação de bactérias benéficas, também podem melhorar o desempenho zootécnico, imunidade e resistência a doenças em tilápias-do-Nilo. Sendo assim, a diversidade e o perfil funcional do microbioma intestinal da tilápia-do-nilo podem ser afetados por vários fatores, incluindo o tipo de alimentação e os aditivos (MENANTEAU-LEDOUBLE et al., 2022).

Os glucanos atuam como prebióticos, pois não são digeríveis na parte superior do trato gastrointestinal dos animais, constituindo um substrato seletivo para um limitado número de bactérias comensais benéficas do trato digestório (BUDIÑO et al., 2015). Os prebióticos estimulam o crescimento, melhoram a disponibilidade de nutrientes, modulam a colonização microbiana, melhoram o desenvolvimento intestinal, modulam respostas de imunidade inatas e adquiridas e aumentam a resistência ao desenvolvimento de possíveis patógenos (BUDIÑO et al., 2015; (SELIM; REDA, 2015).

Até o momento, foram publicados numerosos estudos confirmando as propriedades imunomoduladores potentes dos β -glucanos em muitas espécies de peixes de água doce e marinhos, documentando os efeitos dos β -glucanos na resistência, proteção, sobrevivência e imunidade humoral inata e específica contra patógenos (DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2017; MISRA et al., 2006; VETVICKA; VANNUCCI; SIMA, 2013).

Além disso, verificou-se que a administração de glucanos pode ser realizada por várias vias, incluindo imersão, alimentação ou injeção, as quais melhoram diversos tipos de respostas imunes, resistência a infecções bacterianas, virais e ao estresse ambiental (VETVICKA; VANNUCCI; SIMA, 2013). A grande diversidade de formas de β -glucanos, o processo de extração, o período de administração e nível de inclusão têm implicações nos benefícios desses compostos (KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021; PILARSKI et al., 2017). Há informações conflitantes sobre o período apropriado de administração de β -glucano, especificamente entre períodos mais curtos versus períodos mais longos (DALMO; BØGWALD, 2008).

1.2.2 Vitaminas C e E

As vitaminas são classificadas como solúveis em água (hidrossolúveis) ou solúveis em gordura (lipossolúveis). Algumas vitaminas hidrossolúveis, são exigidas em quantidades relativamente pequenas e têm principalmente funções de coenzima, enquanto a colina, o mioinositol e a vitamina C são necessárias em maiores quantidades e têm outras funções além das coenzimas. As vitaminas A, D, E e K são vitaminas lipossolúveis que funcionam independentemente de enzimas ou, em alguns casos, como a vitamina K, podem ter papéis de coenzima (COUNCIL, 2011).

Entre todas as vitaminas, destacam-se o uso das vitaminas C e E. Elas são importantes aditivos antioxidantes utilizados na indústria alimentícia. Além disso, têm demonstrado reduzir o estresse oxidativo em animais e aumentar o potencial antioxidante quando combinadas (GAO et al., 2014). Na maioria das espécies aquáticas, a biossíntese de vitamina C não ocorre naturalmente, principalmente em peixes, devido à falta da última enzima da via biossintética: L-gulonolactona oxidase (ABO-AL-ELA et al., 2017). A vitamina C é um micronutriente essencial e deve, portanto, ser fornecida através do alimento (TRICHET et al., 2015a) e os principais sinais de deficiência incluem crescimento reduzido, escoliose, lordose, hemorragia interna e das barbatanas, filamentos branquiais distorcidos, erosão das barbatanas, anorexia e aumento da mortalidade (TRICHET et al., 2015).

Devido a seus modos de ação, a vitamina C está envolvida em várias funções fisiológicas, incluindo crescimento, desenvolvimento, reprodução, cicatrização de feridas, resposta a estressores e possivelmente metabolismo lipídico através de sua ação na síntese de carnitina (TRICHET et al., 2015). A vitamina C também promove efeitos benéficos na atividade

bactericida sérica, atividade fagocítica, níveis de anticorpos e atividade da lisozima (KIM; KANG, 2015; TRICHET et al., 2015).

A atividade fagocítica das células do sistema imunológico dos peixes produz espécies reativas de oxigênio que são fatores microbicidas potentes (DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2017). A vitamina C é um dos mais fortes sistemas de defesa antioxidante em peixes. Atua contra espécies reativas de oxigênio intracelulares e extracelulares. Os fagócitos, principais atores da resposta imune inata dos peixes, contêm uma alta concentração de vitamina C em seu citoplasma; isso representa uma forte proteção contra a enorme produção de espécies reativas de oxigênio no combate a patógenos. A vitamina C não age sozinha: colabora com outros antioxidantes (vitamina E, enzimas antioxidantes) para fortalecer ainda mais o sistema de defesa antioxidante do corpo (TRICHET et al., 2015).

Com base na combinação de resultados experimentais obtidos em vários estudos controlados e experiência de campo, o efeito benéfico da suplementação dietética de vitamina C, acima do nível ideal para o crescimento, é recomendado sempre que o sistema imunológico for desafiado (com situações estressantes, como manipulação e classificação, vacinação, feridas de inverno, surto de doenças e transferência marítima) e após ingestão reduzida durante o inverno (TRICHET et al., 2015).

A vitamina E, por sua vez, é um nutriente essencial que desempenha diferentes papéis fisiológicos, como componente estrutural das membranas celulares, e antioxidante intracelular (CLERTON et al., 2001; PUANGKAEW et al., 2004); (WANG; QUINN, 1999). A vitamina E, particularmente o α -tocoferol, atua na proteção de compostos solúveis em gordura da oxidação, manutenção da membrana, sinalização celular, expressão gênica e síntese de eicosanóides (IZQUIERDO; BETANCOR, 2015).

A função mais amplamente documentada da vitamina E é sua atividade antioxidante. Muitas dessas funções têm um impacto relevante no sistema imunológico, quantidades adequadas de α -tocoferol nas dietas para peixes melhoram acentuadamente a saúde dos peixes, promovem resistência ao estresse e, potencialmente, doenças infecciosas (IZQUIERDO; BETANCOR, 2015).

1.2.3 Nucleotídeos

Outra molécula de interesse na formulação de dietas funcionais são os nucleotídeos. Os nucleotídeos têm-se mostrado promissores, mais recentemente, como suplemento alimentar

para aumentar a imunidade e a resistência a doenças de peixes e camarões em sistemas de produção (HOSSAIN; KOSHIO; KESTEMONT, 2020).

Os nucleotídeos são os blocos básicos para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), adenosina trifosfato (ATP) e coenzimas-chave envolvidas em processos metabólicos essenciais. Em condições normais, a produção de nucleotídeos ocorre através da via de recuperação (reciclagem a partir de células mortas) ou da síntese *de novo* a partir de aminoácidos (HOSSAIN; KOSHIO; KESTEMONT, 2020). A rota de produção pela via *de novo* ocorre na maioria das células, porém algumas células como células intestinais, hepatócitos, e células imunes têm capacidade limitada de síntese e precisam de suprimento exógeno, especialmente sob certas condições, por exemplo, lesão tecidual, disfunção hepática, doenças, período de reprodução e estágio de vida de crescimento rápido (ABU-ELALA et al., 2021; HOSSAIN; KOSHIO; KESTEMONT, 2020).

Gil (2002) relatou que nucleotídeos, quando adicionados à dieta de roedores, apresentaram efeitos moduladores, como maturação, ativação e proliferação de linfócitos; fagocitose de macrófagos; respostas de imunoglobulinas; alteração da microbiota intestinal; e expressão gênica de citocinas específicas. Ringo et al. (2011) observaram que a administração de nucleotídeos por via intravenosa ou através da dieta, além de modificar a resposta imunitária também promove a recuperação de órgãos que sofreram danos metabólicos ou inflamatórios.

Os nucleotídeos também foram testados com o objetivo de desenvolver alimentos funcionais com menores quantidades de farinha de peixe. Estas moléculas têm sido utilizadas como aditivos funcionais em dietas alternativas à base de proteínas, onde se verificou que os nucleotídeos reduzem os efeitos negativos das proteínas alternativas, melhorando a eficiência da utilização de proteínas alternativas, o que, por sua vez, que leva a uma melhoria dos índices zootécnicos e saúde dos organismos aquáticos (HOSSAIN; KOSHIO; KESTEMONT, 2020).

As dietas suplementadas com nucleotídeos não são estritamente imunomoduladoras por definição, mas fornecem um suplemento alimentar que permite maior resistência do organismo à infecções por patógenos. Existem inúmeras lacunas no conhecimento existente sobre a aplicação de nucleotídeos exógenos aos peixes, incluindo vários aspectos da digestão, absorção, metabolismo e influências em várias respostas fisiológicas, especialmente expressão de imunógenos e modulação da produção de imunoglobulinas (RINGØ et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de uma mistura funcional de imunomoduladores composta por β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico (vitamina C) e alfa-tocoferol (vitamina E), associada a uma dieta com substituição parcial da proteína animal por proteína de origem vegetal, com menores níveis de inclusão de proteína animal (11,5%) e

maiores em farelo de soja (43,5%). Foram formuladas duas dietas isocalóricas e isoproteicas (35% de proteína bruta), uma com a inclusão da mistura funcional imunomodulador (40 kg.t⁻¹) na dieta, composta por 150 mg.kg⁻¹ de nucleotídeos, 1000 mg.kg⁻¹ de β-glucanos, 1000 mg.kg⁻¹ de ácido ascórbico (vitamina C) e 20 mg.kg⁻¹ de alfa-tocoferol (vitamina E), e outra sem a inclusão. Em um primeiro momento, o objetivo foi avaliar o efeito da suplementação com a mistura funcional no desempenho zootécnico, histologia do fígado, baço e intestino, morfologia intestinal e composição centesimal de juvenis de tilápia-do-nilo após 50 dias de suplementação. Posteriormente, o objetivo foi avaliar o efeito da inclusão da mistura funcional imunomodulador sobre os parâmetros hematológicos, imunológicos, saúde e microbioma intestinal de juvenis de tilápia do nilo após 50 dias de suplementação.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da adição de β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol combinados na dieta de juvenis de tilápia-do-nilo sobre o desempenho zootécnico, saúde, e morfologia intestinal.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a influência da adição de β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol combinados na dieta sobre os parâmetros de desempenho zootécnico e composição corporal de juvenis de tilápia-do-nilo;
- Analisar influência da adição de β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol combinados na dieta sobre os parâmetros hematológicos e imunológicos de juvenis de tilápia-do-nilo;
- Analisar a influência da adição de β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol combinados na dieta sobre a histomorfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo;
- Verificar o efeito da adição de β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol combinados sobre a integridade das células intestinais de juvenis de tilápia-do-nilo através da microscopia eletrônica de transmissão;
- Verificar se a adição de imunomoduladores na dieta de juvenis de tilápia-do-nilo pode alterar a abundância e diversidade do microbioma intestinal quando comparado com o microbioma intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo sem a suplementação com imunomoduladores;

CAPÍTULO I

Mistura funcional de imunomoduladores associada à dieta com alta inclusão de farelo de soja e baixa inclusão de proteína animal melhora índices de desempenho zootécnico e morfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*)

Lúvia Souza de Sá^{a*}, Gabriela Tomas Jerônimo^a, Tiago Soligo^b, Eduardo Yamashita^b, Débora Machado Fracalossi^a, Maurício Laterça Martins^a, José Luiz Pedreira Mouriño^a.

^aLaboratório AQUOS — Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

^bDSM- Nutritional Products Costa Rica, Industrial Park Z, Santo Domingo de Heredia, 40301 Heredia, Costa Rica

*Autor correspondente: Lúvia Souza de Sá. E-mail: luvia.sa@gmail.com. Laboratório AQUOS- Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil. Telefone: (+55) 48 3235-2153.

Artigo redigido conforme as normas do periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia” (ISSN: 0102-0935).

ABSTRACT

Functional feeds such as β -glucans and nucleotides can be used to optimize production, enhancing the immunity and zootechnical performance of cultured fish. The aim of this study was to evaluate the effect of supplementing an immunostimulant functional mixture composed of β -glucans, nucleotides, vitamin C, and vitamin E, associated with a diet with lower levels of animal protein inclusion (11.5%) and higher levels of soybean meal (43.5%), on the zootechnical performance, centesimal composition, and intestinal morphology of Nile tilapia juveniles after 50 days of supplementation. Two isocaloric and isoproteic diets (35% crude protein) were formulated, one with the inclusion of the immunostimulant functional mixture (40 kg.t^{-1}) in the diet, composed of 150 mg.kg^{-1} of nucleotides, 1000 mg.kg^{-1} of β -glucans, 1000 mg.kg^{-1} of ascorbic acid (vitamin C), and 20 mg.kg^{-1} of alpha-tocopherol (vitamin E), and another without this inclusion. At the end of the experimental period, zootechnical indices, fish body composition, and histology (intestinal, hepatic, and splenic) were analyzed. Data were subjected to t-test analysis, considering a significance level of 5% for all tests. The combined supplementation of nucleotides, β -glucans, ascorbic acid, and alpha-tocopherol resulted in a 59.95% increase in final weight, a 64% weight gain, a 66% daily gain, a 21.31% decrease in feed conversion rate, and doubled the retention of body protein in Nile tilapia juveniles. Supplementation with the immunostimulant functional mixture improved intestinal morphology, increasing nutrient absorption, and contributing to the enhanced zootechnical performance of the supplemented diet group.

Keywords: Aquaculture, vitamins, immunomodulators.

RESUMO

Alimentos funcionais como β -glucanos e nucleotídeos podem ser usados para otimizar a produção, melhorando a imunidade e o desempenho zootécnico de peixes cultivados. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de uma mistura funcional imunomodulador composta por β -glucanos, nucleotídeos, vitamina C e vitamina E, associada a uma dieta com níveis de inclusão menores de proteína animal (11,5%) e maiores em farelo de soja (43,5%), no desempenho zootécnico, composição centesimal, morfologia intestinal e histologia hepática, esplênica e intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo após 50 dias de suplementação. Foram formuladas duas dietas isocalóricas e isoproteicas (35% de proteína bruta), uma com a inclusão da mistura funcional imunomodulador (40 kg.t^{-1}) na dieta, composta por 150 mg.kg^{-1} de nucleotídeos, 1000 mg.kg^{-1} de β -glucanos, 1000 mg.kg^{-1} de ácido ascórbico (vitamina C) e 20 mg.kg^{-1} de alfa-tocoferol (vitamina E), e outra sem essa inclusão. Ao final do período experimental, foram analisados índices zootécnicos, composição corporal dos peixes, e histologia (intestinal, hepática e esplênica). Os dados foram submetidos à análise de teste t, considerando um nível de significância de 5% para todos os testes. A suplementação combinada de nucleotídeos, β -glucanos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol resultou em um aumento de 59,95% no peso final, ganho de peso de 64%, ganho diário de 66%, uma diminuição de 21,31% na taxa de conversão alimentar e dobrou a retenção de proteína corporal em juvenis de tilápia do Nilo. A suplementação com a mistura funcional imunomodulador melhorou a morfologia intestinal, aumentando a absorção de nutrientes, e contribuindo para o melhor desempenho zootécnico do grupo com a dieta suplementada.

Palavras-chave: Aquicultura, vitaminas, imunomoduladores.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura emprega rações formuladas com componentes que buscam fornecer nutrientes essenciais para a realização de funções fisiológicas normais nos animais, incluindo a manutenção de um sistema imunológico robusto, o crescimento e a reprodução (Encarnação, 2015). As rações funcionais surgem como um novo padrão emergente no desenvolvimento de dietas para peixes e crustáceos (Encarnação, 2015), e nesse contexto, os aditivos alimentares podem melhorar a saúde e o desempenho zootécnico dos peixes (Carbone; Faggio, 2016).

Componentes como β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E) são comumente adicionados para transformar os alimentos inertes da aquicultura, em rações funcionais. Esses aditivos podem melhorar a imunidade e o desempenho zootécnico dos peixes (Trichet et al., 2015; Ibrahim et al., 2010; Ringø et al., 2011; Gao et al., 2014; Aramli et al., 2015; Izquierdo; Betancor, 2015 Dawood et al., 2017; Jiang et al., 2019).

Os β -glucanos têm um alto potencial de aplicação na indústria aquícola, influenciando positivamente o sistema imunológico inato dos organismos (Dawood et al., 2017; Meena et al., 2013) e exibindo efeitos prebióticos. Segundo Mugwanya et al. (2022), β -glucanos estimulam a proliferação de bactérias benéficas, melhorando o desempenho zootécnico, imunidade e resistência a doenças em tilápias-do-Nilo.

Os nucleotídeos, quando adicionados à dieta de roedores, demonstraram efeitos moduladores no sistema imunológico e na recuperação de órgãos que sofreram danos metabólicos ou inflamatórios (Gil, 2002). Eles também têm sido estudados como ingredientes funcionais para reduzir os efeitos prejudiciais de dietas formuladas com grandes quantidades de farelo de soja em dietas à base de proteínas alternativas (Hossain; Koshio; Kestemont, 2020; Shiao et al., 2015).

As vitaminas C e E são importantes aditivos antioxidantes na indústria de alimentos, reduzindo o estresse oxidativo em animais, e seu uso combinado aumenta o potencial antioxidante (Gao et al., 2014). Na maioria das espécies aquáticas, especialmente peixes, a vitamina C não é biossintetizada devido à ausência da última enzima, a L-gluconolactona oxidase, da rota biossintética (Abo-Al-Ela et al., 2017), sendo, portanto, um micronutriente essencial que deve ser incluído na dieta (Trichet et al., 2015).

Embora o uso de aditivos alimentares tenha sido amplamente estudado, os mecanismos pelos quais esses aditivos alteram o metabolismo e a saúde dos peixes ainda não são bem compreendidos (Elkatatny et al., 2020). Além disso, embora pesquisadores tenham relatado que

o uso individual de β -glucanos, nucleotídeos e vitaminas C e E pode melhorar a saúde e o desempenho zootécnico da tilápia-do-nylo, o conhecimento sobre seu uso combinado é escasso.

É importante ressaltar, que os aditivos alimentares mencionados contribuem positivamente para a sustentabilidade ambiental e econômica, o que é essencial para aumentar a produção aquícola globalmente, especialmente em sistemas de produção intensiva, uma vez que o estado de saúde e funcionalidade está diretamente correlacionado com o desempenho econômico das fazendas aquícolas (Encarnação, 2015).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da combinação de β -glucano, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol associado a uma dieta com alta inclusão de farelo de soja no desempenho zootécnico, saúde, composição centesimal e morfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de manejo dos peixes seguiram o protocolo número 8409161118, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

2.1 DIETA EXPERIMENTAL

As dietas foram formuladas para atender às necessidades nutricionais da tilápia-do-nylo (*O. niloticus*), seguindo as diretrizes dos Requisitos Nutricionais para Peixes e Camarões (NRC, 2011) (Tabela 1). Duas dietas isocalóricas e isoproteicas foram formuladas, e os efeitos da inclusão ou exclusão da mistura funcional de imunomoduladores (Rovimax®, DSM) na dieta foram avaliados. O imunomodulador continha 150 mg.kg^{-1} de nucleotídeos, 1000 mg.kg^{-1} de β -glucanos, juntamente com 1000 mg.kg^{-1} de ácido ascórbico e 20 mg.kg^{-1} de alfa-tocoferol (Tabela 1).

A dose utilizada do aditivo alimentar da mistura funcional de imunomoduladores (40 kg.t^{-1}) foi estabelecida de acordo com a recomendação do fabricante. Portanto, a concentração de cada composto na ração equivalia a 6 mg.kg^{-1} de nucleotídeos, 40 mg.kg^{-1} de β -glucanos, juntamente com 40 mg.kg^{-1} de ácido ascórbico e $0,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ de alfa-tocoferol. As vitaminas presentes na mistura funcional de imunomoduladores são termo protegidas.

As rações foram produzidas por extrusão em pellets de 2 mm. Um misturador horizontal (Inbramaq, Ribeirão Preto, Brasil) foi usado para misturar os componentes secos, e

a extrusão foi realizada em um extrusor de rosca única (MX40, Inbramaq, Ribeirão Preto, Brasil). As condições de extrusão foram previamente testadas e ajustadas para uma temperatura de 85 °C e 24% de umidade. Após a extrusão, a ração foi seca em um forno a 50 °C por 4 horas, embalada e armazenada a -20 °C até o uso posterior.

Tabela 1 - Formulação centesimal e composição (em matéria seca) da dieta controle e da dieta suplementada com a mistura funcional de imunomoduladores.

Ingrediente, g.kg¹	Controle	Imunomodulador
Farelo de soja	485.0	485.0
Farinha de aves	115.0	115.0
Arroz quebrado	234.0	234.0
Milho	135.5	135.5
Óleo de soja	7.0	7.0
Cloreto de colina	2.0	2.0
Premix ¹	1.5	1.5
Mistura funcional de imunomoduladores ²	0.0	40.0
Composição centesimal (g.kg⁻¹)		
Matéria seca	871.6	890.0
Proteína bruta ³	350.8	358.2
Extrato etéreo	55.9	52.0
Matéria mineral ³	54.3	78.6

Fonte: Elaborado pelo autor

¹Composição Premix Rovimix®. DSM: Vitamina A 5.333.000 IU.kg⁻¹; Vitamina D3 1.000.000 IU.kg⁻¹; Vitamina E 66.7 g.kg⁻¹; Vitamina K3 3.33 g.kg⁻¹; Vitamina B1 6.67 g.kg⁻¹; Vitamina B2 10 g.kg⁻¹; Vitamina B6 10 g.kg⁻¹; Vitamina B12 0.013 g.kg⁻¹; Niacina 53.33 g.kg⁻¹; Ácido pantotênico 26.67 g.kg⁻¹; Biotina 0.333 g.kg⁻¹; Ácido fólico 2.67 g.kg⁻¹; Vitamina C 100 g.kg⁻¹; Cobre 3.33 g.kg⁻¹; Ferro 20 g.kg⁻¹; Manganês 16.67 g.kg⁻¹; Iodo 0.67 g.kg⁻¹; Cobalto 0.033 g.kg⁻¹; Zinco 26.6 g.kg⁻¹; Selênio 0.167 g.kg⁻¹. ²Composição do Rovimax®. DSM: β -glucanos 1000 g.t⁻¹. Nucleotídeos 150 g.t⁻¹. Vitamina C 1000 g.t⁻¹; Vitamina E 20 g.t⁻¹. ³Composição centesimal em matéria seca.

2.2 PEIXES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os peixes usados no estudo foram juvenis machos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT, submetidos à inversão sexual. Esses peixes foram obtidos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI).

Para aclimação, os peixes foram inicialmente mantidos em dois tanques de 100 L conectados a um sistema de recirculação aquícola (RAS) por um período de 21 dias. Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados com dieta controle. Posteriormente, os

120 peixes foram redistribuídos aleatoriamente para as unidades experimentais, que consistiam em tanques de 100 L, divididos em grupos de 20 peixes (peso inicial de $1,88 \text{ g} \pm 0,25 \text{ g}$, média \pm desvio padrão) por unidade experimental, resultando em dois tratamentos dietéticos e três repetições cada, totalizando seis unidades experimentais. A quantidade de ração oferecida foi pesada diariamente, e o consumo individual de ração foi registrado para cada tanque. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente quatro vezes ao dia por um período de 50 dias.

Todos os tanques estavam conectados a um sistema RAS com taxa de fluxo contínuo de $0,55 \text{ L/min}$. O sistema estava equipado com filtros mecânicos e biológicos, além de desinfecção ultravioleta. A temperatura e os níveis de oxigênio dissolvido da água foram monitorados diariamente, enquanto outros parâmetros de qualidade da água foram monitorados semanalmente. As medições foram feitas com auxílio de oxímetro digital (temperatura e oxigênio), sensor multiparamétrico (pH) e um kit colorimétrico (amônia total, nitrito e alcalinidade). Os parâmetros de qualidade da água registrados permaneceram dentro da faixa ideal para a tilápia-do-nilo (EL-SHERIF; EL-FEKY, 2009; TRAN-DUY et al., 2008), com os seguintes valores médios \pm desvio padrão: temperatura $27,67 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,35$, oxigênio dissolvido $8,45 \text{ mg/L} \pm 0,74$, pH $7,87 \pm 0,12$, amônia total $0,14 \text{ mg/L} \pm 0,09$, nitrito $0,01 \text{ mg/L} \pm 0,00$ e alcalinidade $40 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$.

2.3 DESEMPENHO ZOOTECNICO E SOBREVIVÊNCIA

Ao final do ensaio de alimentação, os seguintes parâmetros foram calculados usando os dados de peso vivo e consumo de ração para avaliar o desempenho de crescimento e utilização de ração dos peixes:

Ganho de peso (g) = peso final (g) - peso inicial (g)

Ganho de peso diário (g) = (peso final (g) - peso inicial (g)) / duração do período de alimentação

Conversão alimentar (CA) = quantidade de ração oferecida / ganho de peso

Retenção de Proteína (RP, %) = [(peso corporal final \times proteína corporal final) - (peso corporal inicial \times proteína corporal inicial)] / ingestão de proteína

Sobrevivência (%) = (número final de peixes / número inicial de peixes) \times 100

2.4 ANÁLISE PROXIMAL

A análise da composição proximal das amostras de ração e carcaça foi realizada no Laboratório de Nutrição (LabNutri/UFSC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), seguindo o método padrão da Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 2005). Amostras triplicadas de ração e carcaça por dieta foram homogeneizadas, liofilizadas e analisadas quanto a proteína bruta, umidade, lipídeo bruto, cinzas e extrato livre de nitrogênio.

O teor de umidade das amostras foi determinado gravimetricamente por secagem em estufa a 105°C por uma hora até atingir um peso constante, e a porcentagem de umidade foi calculada. O teor de proteína bruta (Nx6,25) foi analisado nas amostras secas seguindo o método de Kjeldahl (Método No. 978.04) após digestão ácida (AOAC, 1997). A gordura bruta foi determinada usando o método de extração Soxhlet com éter de petróleo como solvente (60°C-80°C) por 16 horas (Método No. 930.09) (AOAC, 1997). O teor de cinzas foi determinado pela incineração das amostras em forno a 550°C (Método No. 930.05) (AOAC, 1997). A fibra bruta (FB) foi determinada através de digestão ácida (ácido sulfúrico, 1,25%) e alcalina (hidróxido de sódio, 1,25%) em amostras desengorduradas (Método No. 975.03). O extrato livre de nitrogênio (NFE) foi calculado usando o método de diferença conforme as diretrizes da AOAC (1997).

Os valores energéticos da dieta foram calculados usando os seguintes valores calóricos: 23,9, 39,8 e 17,6 KJ/g para proteína, lipídeo e NFE, respectivamente, com base nas recomendações dos Requisitos Nutricionais para Peixes e Camarões (NRC, 2011).

2.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após 50 dias de alimentação, três peixes por unidade experimental (12 por tratamento) foram anestesiados em solução de eugenol (75 mg L⁻¹) e eutanasiados por seção medular para coleta das amostras histológicas. Fragmentos do fígado, baço e intestino médio foram fixados em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em série de etanol, clarificados em xilol e finalmente emblocados em parafina a 60 °C. Fragmentos com espessura de 3-5 µm (microtomo PAT-MR10) foram corados com hematoxilina eosina de Harris. Após a coloração, as lâminas foram montadas em meio Entellan® e analisadas sob um microscópio de contraste de interferência em fase Axio Imager A.2 (DIC) (Zeiss, Gottingen, Alemanha).

Durante a análise morfológica do intestino médio, os seguintes parâmetros foram medidos em cada secção histológica: número de pregas intestinais, comprimento (μm) e largura (μm) das pregas intestinais, número de células caliciformes, área total (μm^2) e perímetro total (μm) das pregas intestinais. O comprimento, largura, perímetro e área das pregas foram medidos usando o software Zen Pro (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Para a análise histológica de todos os órgãos, os seguintes valores foram atribuídos às alterações histológicas com base no grau de intensidade da alteração: 0 (sem alteração), 1 (ligeira alteração, correspondendo a <25% da área do tecido), 2 (alteração moderada, 25%-50% da área do tecido) e 3 (alteração grave, >50% da área do tecido), seguindo o método descrito por Schwaiger et al. (1997) e modificado por Brum et al. (2018).

Além disso, as seguintes alterações em órgãos/células foram consideradas no fígado: aparência cordonal dos hepatócitos; tamanho uniforme de células e núcleos; grânulos ácidos de zimogênio intactos no pâncreas; aspecto balonoso dos hepatócitos; congestão de pâncreas e sinusoides; infiltrados eosinofílicos e linfocíticos; hipertrofia de hepatócitos; melanomacrófagos soltos; macroesteatose, microesteatose e necrose. No baço, foram avaliadas alterações na integridade das polpas branca e vermelha e centros de melanomacrófagos, melanomacrófagos soltos e necrose. No intestino médio, as alterações histológicas observadas foram: infiltrado eosinofílico e melanomacrófagos soltos.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram avaliados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade da variância foi examinada usando o teste de Levene. Subsequentemente, os dados foram submetidos a um teste t para análise. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Statistica 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA). Um nível de significância de 5% foi considerado para todos os testes.

3. RESULTADOS

3.1 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E SOBREVIVÊNCIA

Os níveis de inclusão de nucleotídeos e β -glucanos por 50 dias foram capazes de melhorar o peso final em 59,95%, o ganho de peso em 64%, o ganho diário em 66%, a conversão alimentar em 21,31% e dobrar a retenção de proteína corporal dos juvenis de tilápia-do-nilo.

Os peixes que receberam dieta suplementada com a mistura funcional de imunomoduladores mostraram valores mais elevados de peso final, ganho de peso, ganho de peso diário, conversão alimentar e retenção proteica ($p < 0.05$) em comparação com aqueles alimentados com a dieta de controle (Tabela 2). Não foi encontrada diferença estatística nos valores de sobrevivência.

Tabela 2 - Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas controle e suplementadas com a mistura funcional de imunomoduladores (40 g.kg^{-1}). Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

	Controle	Imunomodulador	P value
Peso final, g	18.46 \pm 1.28	29.53 \pm 1.62*	0.0008
Ganho de peso, g	16.79 \pm 0.99	27.55 \pm 1.63*	0.0006
Ganho de peso diário, g	0.33 \pm 0.01	0.55 \pm 0.04*	0.0006
Conversão alimentar	1.22 \pm 0.06	0.96 \pm 0.03*	0.0089
Retenção Proteica (PR, %)	25.57 \pm 4.16	52.58 \pm 6.16*	0.0033
Sobrevivência, %	75.33 \pm 29.97	91.00 \pm 12.57	0.5347

(*) Indica diferença estatística entre a suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores pelo Teste T com nível de significância de 5%.

3.2 ANÁLISE PROXIMAL

Na composição corporal, apenas a matéria mineral $2,21 \pm 0,184 \text{ (g.kg}^{-1}\text{)}$ ($p = 0,0376$) foi afetada pela dieta de suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores após o período de 50 dias de suplementação (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição corporal (g.kg^{-1} de peso úmido) (média \pm desvio padrão) de juvenis de tilápia alimentados com dietas controle e suplementadas com a mistura funcional de imunomoduladores (40 g.kg^{-1}).

Composição centesimal (g.kg^{-1})			
	Controle	Imunomodulador	P value
Matéria seca	27.45 \pm 0.512	26.732 \pm 0.829	0.1901
Proteína bruta ³	54.47 \pm 3.273	56.76 \pm 2.296	0.1190
Extrato etéreo	25.05 \pm 0.093	27.11 \pm 1.61	0.0973
Matéria mineral ³	1.70 \pm 0.305	2.21 \pm 0.184*	0.0376

Fonte: Elaborado pelo autor

*: Indica diferença estatística entre a suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores pelo Teste T com nível de significância de 5%.

3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após o período de 50 dias de suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores, o comprimento de $37,88 \pm 4,20 \mu\text{m}$ ($p = 0,0481$), a largura de $17,29 \pm 2,89 \mu\text{m}$ ($p = 0,0380$) das pregas intestinais e o número de células caliciformes de $501,55 \pm 83,82$ ($p = 0,0389$) do intestino dos peixes, aumentaram (**Tabela 5**). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na histologia do intestino, baço e fígado entre os diferentes tratamentos (Tabela 5 e Tabela 6).

Tabela 5 - Morfologia intestinal e intensidade de alterações histológicas (média \pm desvio padrão) no intestino de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas controle e suplementadas com a mistura funcional de imunomoduladores (40 g.kg^{-1}).

	Controle	Imunomodulador	P Value
Morfologia intestinal			
Número de pregas intestinais	36.22 \pm 8.95	43.33 \pm 1.15	0.2441
Comprimento (μm)	22.76 \pm 8.29	37.88 \pm 4.20*	0.0481
Largura (μm)	10.56 \pm 2.85	17.29 \pm 2.89*	0.0380
Número de células caliciformes (x10)	311.11 \pm 69.60	501.55 \pm 83.82*	0.0389
Área total (x10 ³ μm^2)	31.19 \pm 15.91	38.76 \pm 9.95	0.3190
Perímetro total (x10 ³ μm)	4.35 \pm 1.16	5.02 \pm 0.57	0.3142
Alterações histológicas			
Infiltrado eosinofílico	1.11 \pm 0.19	1.22 \pm 0.83	0.2302
Melanomacrófagos soltos	0.08 \pm 0.19	0.33 \pm 0.57	0.3739

*: Indica diferença estatística entre a suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores pelo Teste T com um nível de significância de 5%.

Tabela 6 - Intensidade de alterações histológicas (média \pm desvio padrão) nos tecidos do fígado e baço de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados por 50 dias com dietas controle e suplementadas com mistura funcional de imunomodulador (40 g.kg⁻¹).

Alterações histológicas no fígado	Controle	Imunomodulador	<i>P Value</i>
Aspecto cordonal	1,44 \pm 0,50	2,00 \pm 0,66	0,315
Aspecto balonoso dos hepatócitos	2,11 \pm 0,50	1,77 \pm 0,19	0,348
Congestão do pâncreas	1,55 \pm 0,19	1,44 \pm 0,19	0,518
Congestão dos sinusoides	1,00 \pm 0,33	1,44 \pm 0,69	0,373
Infiltrado eosinofílico	1,44 \pm 0,38	1,77 \pm 0,19	0,250
Infiltrado linfocítico	0,55 \pm 0,69	0,22 \pm 0,19	0,467
Hipertrofia dos hepatócitos	2,11 \pm 0,50	1,55 \pm 0,86	0,351
Macroesteatose	2,22 \pm 0,50	2,00 \pm 0,57	0,643
Microesteatose	0,22 \pm 0,38	0,33 \pm 0,57	0,795
Necrose	2,11 \pm 0,83	1,56 \pm 0,50	0,382
Alterações histológicas no baço	Controle	Imunomodulador	<i>P Value</i>
Integridade da polpa branca	2,83 \pm 0,28	2,83 \pm 0,28	>0,999
Integridade da polpa vermelha	2,83 \pm 0,28	2,83 \pm 0,28	>0,999
Centros de melanomacrófagos	1,167 \pm 0,76	1,00 \pm 0,00	0,724
Melanomacrófagos soltos	0,83 \pm 0,28	1,00 \pm 0,00	0,373
Necrose	0,83 \pm 0,76	0,83 \pm 0,76	>0,999

4 DISCUSSÃO

Períodos mais longos de administração de imunomoduladores têm sido associados à superestimulação e conseqüente exaustão do sistema imunológico (KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021; MACHUCA et al., 2022; RINGØ et al., 2011). De acordo com Koch, Oliveira & Zanuzzo (2021), períodos de suplementação com imunomoduladores acima de 45 dias são considerados longos. No presente estudo, aos 50 dias de alimentação, não observamos quaisquer efeitos negativos na saúde e no crescimento dos peixes alimentados com a dieta suplementada. Não houve diferenças estatísticas nas taxas de sobrevivência, mas os peixes alimentados com a dieta suplementada apresentaram maior ganho de peso.

O nível de inclusão de β -glucanos avaliado é considerado baixo (0,004%), uma vez que Koch, Oliveira & Zanuzzo (2021) avaliaram níveis de inclusão de 0,1% em juvenis de

tilápia do Nilo (por 45 dias), Sabioni et al. (2020) avaliaram a inclusão de 0,5% (por 10 dias) na dieta de juvenis de *Piaractus mesopotamicus*, e Menanteau-Ledouble et al. (2022) avaliaram níveis de inclusão de até 0,05% (por 6 semanas) na dieta de juvenis de *Oncorhynchus mykiss*.

O melhor desempenho zootécnico observado nos peixes que receberam a dieta suplementada também pode ser atribuído à inclusão de nucleotídeos. Os nucleotídeos têm sido estudados como ingredientes funcionais em dietas à base de proteínas alternativas. (HOSSAIN; KOSHIO; KESTEMONT, 2020; REDA et al., 2018; RINGØ et al., 2011; SHIAU; GABAUDAN; LIN, 2015). De acordo com Bowyer et al. (2019), a inclusão de nucleotídeos na dieta pode ser usada para mitigar os efeitos prejudiciais de dietas formuladas com grandes quantidades de farelo de soja. Shiau et al. (2015) avaliaram a influência positiva de nucleotídeos em uma dieta à base de baixo teor de farinha de peixe para tilápia e relataram que nucleotídeos suplementados em 120–240 mg kg⁻¹ por 10 semanas em dieta com baixo teor de farinha de peixe (6%) e alto teor de farelo de soja (56%) para juvenis de tilápia híbrida melhoraram as respostas imunológicas e a sobrevivência após desafio com *Streptococcus iniae*.

Em nosso estudo, a inclusão de uma mistura funcional de imunomoduladores (40 kg ton⁻¹) na dieta, que contém 150 mg kg⁻¹ de nucleotídeos, 1000 mg kg⁻¹ de β-glucanos, juntamente com 1000 mg kg⁻¹ de ácido ascórbico e 20 mg kg⁻¹ de alfa-tocoferol, foi capaz de melhorar o desempenho zootécnico e a saúde dos peixes, associados a uma dieta com quantidade relativamente baixa de proteína animal (11,5%) e maior quantidade de farelo de soja (43,5%). O aumento na quantidade de matéria mineral na composição proximal do corpo observado nos peixes que receberam a dieta suplementada ocorreu devido ao fato de que a dieta suplementada continha níveis mais elevados de matéria mineral em comparação com a dieta controle. Isso pode ser atribuído às diferenças na formulação das duas dietas, uma vez que variou a concentração de minerais em cada ingrediente (PRABHU; SCHRAMA; KAUSHIK, 2016).

Há informações conflitantes sobre o período adequado de administração de β-glucanos, especificamente entre períodos curtos *versus* períodos longos (DALMO; BØGWALD, 2008). Koch, Oliveira & Zanuzzo (2021) destacaram que níveis de inclusão de β-glucanos na dieta acima de 0,1% por períodos superiores a 45 dias poderiam ativar mecanismos de resposta ao estresse. Além disso, de acordo com alguns autores, doses excessivas de β-glucanos podem resultar em respostas imunológicas inadequadas, provavelmente devido à ativação de mecanismos de resposta ao estresse (ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021; SABIONI et al., 2020).

As respostas ao estresse geralmente envolvem alterações nos sistemas de defesa como, proteínas do choque térmico, sistemas antioxidantes, imunidade e, mais importante, no metabolismo energético. (PETITJEAN et al., 2019). Peixes expostos a mecanismos estressantes tendem a apresentar aumento no consumo de energia e nas defesas antioxidantes, e à medida que a demanda energética para manutenção aumenta, a energia disponível para crescimento, reprodução, atividade e armazenamento de reservas diminui. Isso pode resultar em redução temporária na massa corporal, no crescimento e/ou na reprodução (GANDAR et al., 2017). Uma estratégia para evitar os potenciais mecanismos de resposta ao estresse dos imunomoduladores foi adicionar as vitaminas E e C juntamente com a baixa inclusão de β -glucanos e nucleotídeos. A vitamina C e a vitamina E podem atuar como antioxidantes de maneira sinérgica (TRICHET et al., 2015).

Abu-Elala et al. (2021) observaram que a inclusão dietética de extratos fermentados provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*, correspondendo a níveis de inclusão de 252 mg kg⁻¹ de nucleotídeos, 940 mg kg⁻¹ de β -glucanos e 568 mg kg⁻¹ de MOS por 6 meses, foi capaz de aprimorar a nutrição, imunidade e histomorfologia intestinal de reprodutores de tilápia-do-nilo. Em consonância com os achados relatados por Abu-Elala et al. (2021), a histomorfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo foi melhorada pela dieta suplementada com imunomoduladores.

Os achados são consistentes com os descritos por Bowyer et al. (2019), onde o robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) alimentado com dieta suplementada com 0,15% e 0,3% de nucleotídeos mostrou uma tendência para melhorar o desempenho de crescimento. Além disso, a provisão de nucleotídeos na dieta influenciou positivamente a topografia funcional do trato gastrointestinal do robalo-Europeu.

Identificamos melhoria na saúde intestinal, com aumento no número de células caliciformes por corte histológico, comprimento largura e largura das pregas intestinais que provavelmente se refletiu em aprimoramento significativo no desempenho zootécnico e nos níveis de retenção de proteínas. A morfologia intestinal reflete a associação entre o estado de saúde dos peixes com a capacidade de assimilação de nutrientes e a função imunológica (NICHOLSON et al., 2012). Esses fatores podem ter contribuído para índices zootécnicos melhores nos peixes suplementados com a mistura funcional de imunomoduladores, pois foi observado aumento no comprimento das dobras intestinais, na largura das dobras e no número de células caliciformes no grupo suplementado com o imunomodulador. Um aumento na área de superfície das dobras intestinais indica melhoria na saúde intestinal e aumento na capacidade de absorção de nutrientes (MOHAMED et al., 2014).

O aumento no número de células caliciformes reflete em maior produção de muco. O muco do epitélio dos peixes desempenha diversas funções; por exemplo, atua como componente integral do mecanismo imunológico inato, age como barreira mecânica que dificulta a entrada de bactérias patogênicas e contém vários componentes antimicrobianos, como lisozimas, imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento e lectinas, da resposta imunológica inata (SUBRAMANIAN; MACKINNON; ROSS, 2007). Essas funções podem ajudar na fixação de um microbioma bacteriano benéfico ao sistema imunológico para melhor absorção dos nutrientes, o que, por sua vez, pode ter melhorado as taxas zootécnicas nos grupos suplementados com a mistura funcional de imunomoduladores. A melhor otimização dos nutrientes da ração também aprimorou a eficiência de retenção de proteínas, consequentemente reduzindo a liberação de nutrientes residuais (amônia e fósforo) no ambiente. (ELVY et al., 2022).

Os resultados sugerem que a suplementação de dietas para peixes com mistura funcional de imunomoduladores, incluindo nucleotídeos e β -glucanos, juntamente com antioxidantes como as vitaminas C e E, pode melhorar a saúde intestinal, a eficiência do desempenho zootécnico e a retenção de proteínas, mesmo em dietas com baixo teor de proteína animal e alto teor de farelo de soja. No entanto, é importante realizar mais pesquisas para entender completamente os efeitos a longo prazo e as melhores práticas de suplementação em diferentes espécies de peixes e condições de cultivo.

O potencial de ingredientes alimentares funcionais, como nucleotídeos e β -glucanos, para melhorar a integridade estrutural e topografia funcional do trato gastrointestinal, como os parâmetros zootécnicos na aquicultura, ainda é relativamente pouco explorado e deve ser investigado de forma mais aprofundada usando tecnologias modernas apropriadas. Estudos adicionais ainda são necessários, mas o presente estudo permite avaliar a redução no uso de proteína animal na dieta, juntamente com o efeito de nucleotídeos, β -glucanos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol. Em conjunto, esses compostos podem fornecer ao organismo do peixe as ferramentas necessárias para alcançar uma saúde e crescimento ótimos.

5 CONCLUSÃO

A suplementação dietética com uma mistura funcional de imunomoduladores, contendo nucleotídeos e β -glucanos melhorou o desempenho zootécnico e a saúde intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo, mesmo em dietas com baixo teor de proteína animal e alto teor de farelo de soja em relação as dietas comerciais. Os resultados mostraram um aumento no peso final, ganho

de peso, ganho diário, conversão alimentar e retenção de proteínas nos peixes alimentados com a dieta suplementada, em comparação com aqueles alimentados com a dieta de controle. Além disso, observou-se uma melhoria na integridade estrutural do trato gastrointestinal, evidenciada pelo aumento no comprimento e largura das pregas intestinais, bem como no número de células caliciformes. Esses achados sugerem que a inclusão desses ingredientes funcionais na dieta dos peixes pode promover uma melhor absorção de nutrientes, fortalecer o sistema imunológico e aumentar a eficiência de conversão alimentar. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente os efeitos a longo prazo e as melhores práticas de suplementação em diferentes espécies de peixes e condições de cultivo.

Comitê de ética

Todas as diretrizes internacionais, nacionais e/ou institucionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais foram seguidas. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC 6882170516).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida a L. S. Sá e pelo apoio financeiro (Código Financeiro 001), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de pesquisa a M.L. Martins (CNPq 305869/2014–0) e J.L.P. Mouriño (CNPq 301524/2017–3) e à equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, pelo uso de seu microscópio eletrônico de transmissão.

REFERÊNCIAS

ABO-AL-ELA, H. G. et al. Vitamin C Modulates the Immunotoxic Effect of 17α -Methyltestosterone in Nile Tilapia. **Biochemistry**, v. 56, n. 14, p. 2042–2050, 2017.

ABU-ELALA, N. M. et al. Analysis of the productivity, immunity, and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock-fed dietary fermented extracts sourced from *Saccharomyces cerevisiae* (hilyses): A field trial. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 1 mar. 2021.

- AMAL, M. N. A.; SAAD, M. Z. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. **PERTANIKA Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, p. 195–206, 1 ago. 2011.
- ARAMLI, M. S.; KAMANGAR, B.; NAZARI, R. M. Effects of dietary β -glucan on the growth and innate immune response of juvenile *Persian sturgeon*, *Acipenser persicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 47, n. 1, p. 606–610, 2015.
- ASENCIOS, O. Y. et al. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 74–79, 2016.
- BABICKI, S. et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. W147–W153, 1 abr. 2016.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 30 de 07 de agosto de 2009**, 2009.
- BUDIÑO, F. E. L. et al. Desempenho e digestibilidade de leitões alimentados com rações contendo feno de alfafa e frutoligossacarídeo na fase inicial. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 4, p. 796–810, dez. 2015.
- BULLER, N. B. **Bacteria from Fish and other aquatic animals**. 1. ed. Oxfordshire: CABI Publishing, 2004.
- CARBALLO, C. et al. Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 92, p. 31–39, 1 set. 2019.
- CARBONE, D.; FAGGIO, C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 54, p. 172–178, 2016.
- CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.; GIOACCHINI, G. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. **Aquaculture**, v. 472, n. March, p. 144–155, 2017.
- CLERTON, P. et al. Dietary vitamin e and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: Effect on gut and on head kidney leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2001.
- CORNET, V. et al. GAS1: A New β -Glucan Immunostimulant Candidate to Increase Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Resistance to Bacterial Infections With *Aeromonas salmonicida* *achromogenes*. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 6 jul. 2021.
- COUNCIL, N. R. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.
- D'ABRAMO, L. R. Fulfilling the Potential of Probiotics, Prebiotics, and Enzymes as Feed Additives for Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 49, n. 3, p. 444–446, 2018.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. **β -glucans as conductors of immune symphonies. Fish and Shellfish Immunology.** Academic Press, , 2008.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M. Á. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: A review. **Reviews in Aquaculture**, p. 1–25, 2017.

DELUCA, H. F. Vitamin D: its role and uses in immunology. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, p. 2579–2585, 2001.

DIMITROGLOU, A. et al. **Microbial manipulations to improve fish health and production - A Mediterranean perspective. Fish and Shellfish Immunology.** Academic Press, , 2011.

ENCARNAÇÃO, P. Functional feed additives in aquaculture feeds. Em: **Aquafeed Formulation.** [s.l.] Academic Press, 2015. p. 217–237.

ENCARNAÇÃO, P. 5 - Functional feed additives in aquaculture feeds. Em: NATES, S. F. B. T.-A. F. (Ed.). San Diego: Academic Press, 2016. p. 217–237.

GAO, J. et al. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance , fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. **Aquaculture**, v. 422–423, p. 84–90, 2014.

GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S1–S4, 2002.

HOSSAIN, M. S.; KOSHIO, S.; KESTEMONT, P. **Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture.** Wiley-Blackwell, , 1 maio 2020.

IREGUI, C. A. et al. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis spp.* **Journal of Fish Diseases**, v. 39, n. 2, p. 205–215, 2016.

IZQUIERDO, M.; BETANCOR, M. **Vitamin E. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health: Wiley Online Books.**, 5 maio 2015.

JENG, S. S. et al. Anoxia survival in common carp and crucian carp is related to high zinc concentration in tissues. **Fisheries Science**, v. 74, n. 3, p. 627–634, 2008.

KHANJANI, M. H. et al. **Biofloc: A sustainable dietary supplement, nutritional value and functional properties. Aquaculture.** Elsevier B.V., , 15 jan. 2023.

KHANJANI, M. H.; SHARIFINIA, M.; HAJIREZAEI, S. **Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming. Aquaculture.** Elsevier B.V., , 15 abr. 2022.

KIM, J. H.; KANG, J. C. Influence of dietary ascorbic acid on the immune responses of juvenile Korean rockfish *Sebastes Schlegelii*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 27, n. 3, p. 178–184, 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. A.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 112, p. 56–63, 1 maio 2021.
- LANGILLE, M. G. I. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814–821, set. 2013.
- LOVELL, T. **Nutrition and Feeding of Fish**. Boston, MA: Springer US, 1989.
- MACHUCA, C. et al. **Yeast β -Glucans as Fish Immunomodulators: A Review**. **Animals**. MDPI, , 1 ago. 2022.
- MEENA, D. K. et al. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431–457, 2013.
- MENANTEAU-LEDOUBLE, S. et al. Modulation of gut microbiota, blood metabolites, and disease resistance by dietary β -glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal Microbiome**, v. 4, n. 1, 20 nov. 2022.
- MISRA, C. K. et al. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, v. 255, n. 1–4, p. 82–94, 2006.
- MOURIÑO, J. L. P. et al. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma sp.*). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 73–80, 29 jun. 2011.
- MUGWANYA, M. et al. **Updating the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Tilapia Aquaculture as Leading Candidates for Food Sustainability: a Review. Probiotics and Antimicrobial Proteins**. Springer, , 1 fev. 2022.
- MUSHARRAF, M.; KHAN, M. A. Dietary magnesium requirement for fingerlings of Rohu (*Labeo rohita*). v. 496, n. July, p. 96–104, 2018.
- OFEK, T. et al. Comparative Study of Intestinal Microbiota Composition of Six Edible Fish Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 7 dez. 2021.
- PILARSKI, F. et al. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 25–29, 2017.
- PUANGKAEW, J. et al. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, n. 1, p. 25–39, 2004.
- RINGØ, E. et al. Use of Immunostimulants and Nucleotides in Aquaculture: A Review. **Journal of Marine Science: Research & Development**, v. 02, n. 01, p. 1–22, 2011.
- RINGØ, E.; SONG, S. K. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 4–24, 2016.

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

RODRIGUES, M. V. et al. **Development of Fish Immunity and the Role of β -Glucan in Immune Responses**. **Molecules**. MDPI, , 1 nov. 2020.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1–2, p. 63–92, 1999.

SALGER, S. A. et al. Enhanced biodiversity of gut flora and feed efficiency in pond cultured tilapia under reduced frequency feeding strategies. **PLoS ONE**, v. 15, n. 7 July, 1 jul. 2020.

SALVADOR, R. et al. Isolamento de *Streptococcus spp.* de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 35, 10 maio 2003.

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.

SENADHEERA, S. D. et al. Effects of dietary iron supplementation on growth performance , fatty acid composition and fatty acid metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed vegetable oil based diets. **Aquaculture**, v. 342–343, p. 80–88, 2012.

SHIAU, S.-Y.; LIN, Y.-H. **Vitamins (Excluding C and E). Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health**: Wiley Online Books., 5 maio 2015.

SOUZA, F. P. DE et al. Effect of β -glucan in water on growth performance, blood status and intestinal microbiota in tilapia under hypoxia. **Aquaculture Reports**, v. 17, 1 jul. 2020.

TACON, A. G. J.; METIAN, M.; MCNEVIN, A. A. **Future Feeds: Suggested Guidelines for Sustainable Development. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**. Taylor and Francis Ltd., , 2022.

TAYLOR, P.; HEDRICK, R. P. Journal of Aquatic Animal Health Relationships of the Host , Pathogen , and Environment : Implications for Diseases of Cultured and Wild Fish Populations. n. September 2014, p. 37–41, 2011.

THOMPSON, I. et al. The Effect of Dietary Vitamin-a and Astaxanthin on the Immunocompetence of Rainbow Trout. **Aquaculture**, v. 133, n. 2, p. 91–102, 1995.

TRICHET, V. V. et al. **The Effect of Vitamin C on Fish Health. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health**: Wiley Online Books., 5 maio 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch7>>

TUCKER, C. S.; HARGREAVES, J. A. **Environmental Best Management Practices for Aquaculture Environmental Best Management Practices for Aquaculture Edited by**. [s.l: s.n.].

VALLEJOS-VIDAL, E. et al. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 56, p. 34–69, 2016.

VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The effects of β - Glucan on fish immunity. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 10, p. 580–588, 2013.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. **Dietary modulation of immune function by β -glucans. Physiology and Behavior.** Elsevier Inc., , 23 maio 2008.

WANG, X.; QUINN, P. J. Vitamin E and its function in membranes. v. 38, p. 309–336, 1999.

WATANABE, T. Trace minerals in fish nutrition. v. 151, p. 185–207, 1997.

WEBSTER, C. D.; LIM, C. **Minerals. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health:** Wiley Online Books., 5 maio 2015.

YANG, Q. et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of the elongation factor Tu against *Streptococcus agalactiae* in tilapia. **Aquaculture**, v. 492, p. 184–189, 2018.

YI, M. et al. An investigation into the effects of *Streptococcus agalactiae* on the 5-HT system and the behavior of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, v. 15, n. September, p. 100232, 2019.

ZHANG, D. et al. An effective live attenuated vaccine against *Streptococcus agalactiae* infection in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, 2019.

ZHANG, Z. et al. Characterization of the core gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication of a putative novel *Cetobacterium* species and analysis of its potential function on nutrition. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 12, 1 dez. 2022.

CAPÍTULO II

Efeito da suplementação com β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol associada à dieta com alta inclusão de farelo de soja sobre os parâmetros hemato-imunológicos e microbioma intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo

Lúvia Souza de Sá^{a*}, Tiago Soligo^b, Eduardo Yamashita^b, Débora Machado Fracalossi^a, Maurício Laterça Martins^a, José Luiz Pedreira Mouriño^a.

^aLaboratório AQUOS — Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

^bDSM- Nutritional Products Costa Rica, Industrial Park Z, Santo Domingo de Heredia, 40301 Heredia, Costa Rica

*Autor correspondente: Lúvia Souza de Sá. E-mail: luvia.sa@gmail.com. Laboratório AQUOS- Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil. Telefone: (+55) 48 3235-2153.

Artigo redigido conforme as normas do periódico “Boletim do Instituto de Pesca” (ISSN: 1678-2305).

ABSTRACT

Functional feeds such as β -glucans and nucleotides can be utilized to optimize production, enhancing the immunity and zootechnical performance of cultured fish. The objective of this study was to evaluate the effect of supplementing an immunostimulant functional mixture composed of β -glucans, nucleotides, vitamin C, and vitamin E, in conjunction with a diet with lower levels of animal protein inclusion (11.5%) and higher levels of soybean meal (43.5%), on the health and intestinal microbiome of Nile tilapia juveniles after 50 days of supplementation. Two isocaloric and isoproteic diets (35% crude protein) were formulated, one with the inclusion of the immunostimulant functional mixture (40 kg.t⁻¹) in the diet, composed of 150 mg.kg⁻¹ of nucleotides, 1000 mg.kg⁻¹ of β -glucans, 1000 mg.kg⁻¹ of ascorbic acid (vitamin C), and 20 mg.kg⁻¹ of alpha-tocopherol (vitamin E), and another without this inclusion. At the end of the experimental period, hematological and immunological parameters, intestinal microbiome, and transmission electron microscopy were analyzed to assess the integrity of microvilli and intestinal cells. Hemato-immunological analysis data were subjected to t-test analysis, considering a significance level of 5% for all tests. To estimate bacterial richness and diversity in the sampled periods, an α -rarefaction analysis, sequencing coverage, Chao1, and Shannon indices were performed using the "alpha_diversity.py" tool. The combined supplementation of nucleotides, β -glucans, ascorbic acid, and alpha-tocopherol was able to modulate the intestinal microbiome, increasing Chao-1 diversity. Transmission electron microscopy confirmed that fish fed with both diets exhibited intact intestinal mucosal membranes. Supplementation did not alter the hematological and immunological parameters of the fish, suggesting that there was no overstimulation of the fish's immune system.

Keywords: Aquaculture, vitamins, immunomodulators.

RESUMO

Alimentos funcionais como β -glucanos e nucleotídeos podem ser usados para otimizar a produção, melhorando a imunidade e o desempenho zootécnico de peixes cultivados. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de uma mistura funcional imunomodulador composta por β -glucanos, nucleotídeos, vitamina C e vitamina E, associada a uma dieta com níveis de inclusão menores de proteína animal (11,5%) e maiores em farelo de soja (43,5%), na saúde e microbioma intestinal de juvenis de tilápia do Nilo após 50 dias de suplementação. Foram formuladas duas dietas isocalóricas e isoproteicas (35% de proteína bruta), uma com a inclusão da mistura funcional imunomodulador (40 kg.t⁻¹) na dieta, composta por 150 mg.kg⁻¹ de nucleotídeos, 1000 mg.kg⁻¹ de β -glucanos, 1000 mg.kg⁻¹ de ácido ascórbico (vitamina C) e 20 mg.kg⁻¹ de alfa-tocoferol (vitamina E), e outra sem essa inclusão. Ao final do período experimental, foram analisados os parâmetros hematológicos e imunológicos, microbioma intestinal, e microscopia eletrônica de transmissão para avaliar a integridade das microvilosidades e das células intestinais. Os dados das análises hemato-imunológicas foram submetidos à análise de teste t, considerando o nível de significância de 5% para todos os testes. Para estimar a riqueza e a diversidade bacteriana nos períodos amostrados, foi realizada análise de rarefação α , índices Cobertura de Sequenciamento, Chao1 e Shannon, através da ferramenta "alpha_diversity.py". A suplementação combinada de nucleotídeos, β -glucanos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol foi capaz de modular o microbioma intestinal, aumentando a diversidade Chao-1. A microscopia eletrônica de transmissão confirmou que os peixes alimentados com ambas as dietas apresentaram membranas mucosas intestinais intactas. A suplementação não alterou os parâmetros hematológicos e imunológicos dos peixes, sugerindo que não houve superestimulação do sistema imunológico dos peixes.

Palavras-chave: Aquicultura, vitaminas, imunomoduladores.

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura utiliza rações formuladas com vários componentes que, quando fornecidos aos animais, fornecem nutrientes essenciais para realizar funções fisiológicas normais, incluindo a manutenção de um sistema imunológico natural, o crescimento e a reprodução (Encarnação, 2015).

As rações funcionais são um novo padrão emergente no desenvolvimento de dietas para peixes e crustáceos (Encarnação, 2015). Nesse contexto, aditivos alimentares podem melhorar a saúde e o desempenho zootécnico dos peixes (Carbone e Faggio, 2016). A ração é transformada em ganho de biomassa no sistema digestivo do animal (Encarnação, 2015).

Componentes como β -glucanos, nucleotídeos, ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E) são comumente adicionados em rações funcionais. Esses aditivos podem melhorar a imunidade e o desempenho zootécnico dos peixes (Trichet et al., 2015; Ibrahim et al., 2010; Ringø et al., 2011; Gao et al., 2014; Aramli et al., 2015; Izquierdo; Betancor, 2015; Dawood et al., 2017; Jiang et al., 2019).

Os aditivos alimentares mencionados acima contribuem positivamente para a sustentabilidade ambiental e econômica, o que é essencial para aumentar a produção aquícola globalmente, especialmente em sistemas de produção intensiva, uma vez que o estado de saúde e funcionalidade está diretamente correlacionado com o desempenho econômico das fazendas aquícolas (Encarnação, 2015).

Os β -glucanos têm um alto potencial de aplicação na indústria aquícola. É um imunomodulador amplamente utilizado, pois influencia no sistema imunológico inato dos organismos, promovendo o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (Dawood et al., 2017; Meena et al., 2013). Além disso, os β -glucanos ativam os macrófagos em peixes, aumentando assim sua capacidade de combater patógenos (Ringø and Song, 2016). Cornet et al. (2021) descobriram que dietas suplementadas com β -glucanos não afetaram o desempenho de crescimento, mortalidade ou atividade respiratória de leucócitos em trutas arco-íris, no entanto, o β -glucano desencadeou diferentes efetores imunológicos, dependendo da dose ou duração da exposição.

Gil (2002) relatou que os nucleotídeos, quando adicionados à dieta de roedores, mostraram efeitos moduladores, como maturação, ativação e proliferação de linfócitos; fagocitose de macrófagos; respostas de imunoglobulinas; microbiota intestinal; e expressão gênica de citocinas específicas. Além disso, a administração de nucleotídeos por via intravenosa

ou através da dieta modifica a resposta imune e a recuperação de órgãos que sofreram danos metabólicos ou inflamatórios (Ringø et al., 2011).

Por outro lado, as vitaminas C e E são importantes aditivos antioxidantes usados na indústria de alimentos, pois reduzem o estresse oxidativo em animais, e seu uso combinado aumenta o potencial antioxidante (Gao et al., 2014). Na maioria das espécies aquáticas, especialmente peixes, a vitamina C não é biossintetizada devido à ausência da última enzima, a L-gluconolactona oxidase, da rota biossintética (Abo-Al-Ela et al., 2017). Como a vitamina C é um micronutriente essencial, ela deve ser incluída na dieta (Trichet et al., 2015).

Entre as várias funções da vitamina E que influenciam o sistema imunológico, sua atividade antioxidante é a função mais amplamente documentada. Quantidades adequadas dessa vitamina nas dietas podem melhorar a saúde dos peixes e promover a resistência dos peixes ao estresse e doenças infecciosas (Izquierdo and Betancor, 2015).

Embora o uso de aditivos alimentares tenha sido amplamente estudado, os mecanismos pelos quais esses aditivos alteram o metabolismo e a capacidade imunológica dos peixes ainda não são bem compreendidos (Elkatatny et al., 2020). Além disso, embora muitos pesquisadores tenham relatado que o uso individual de β -glucanos, nucleotídeos e vitaminas C e E pode melhorar o sistema imunológico e o desempenho zootécnico da tilápia-do-nylo, o conhecimento sobre seu uso combinado é escasso.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da combinação de β -glucano, nucleotídeos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol associado a uma dieta com alta inclusão de farelo de soja no estado de saúde e microbioma intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de manejo dos peixes seguiram o protocolo número 8409161118, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

2.1 DIETA EXPERIMENTAL

As dietas foram formuladas para atender às necessidades nutricionais da tilápia-do-nylo, seguindo as diretrizes dos Requisitos Nutricionais para Peixes e Camarões (NRC, 2011) (Tabela 1). Foram formuladas duas dietas isocalóricas e isoproteicas, e os efeitos da inclusão ou exclusão da mistura funcional de imunomoduladores (Rovimax®, DSM) na dieta foram

avaliados. O imunomodulador continha 150 mg.kg⁻¹ de nucleotídeos, 1000 mg.kg⁻¹ de β-glucanos, juntamente com 1000 mg.kg⁻¹ de ácido ascórbico e 20 mg.kg⁻¹ de alfa-tocoferol (Tabela 1).

A dose utilizada do aditivo alimentar da mistura funcional de imunomoduladores (40 kg.t⁻¹) foi estabelecida de acordo com a recomendação do fabricante. Portanto, a concentração de cada composto na ração equivalia a 6 mg.kg⁻¹ de nucleotídeos, 40 mg.kg⁻¹ de β-glucanos, juntamente com 40 mg.kg⁻¹ de ácido ascórbico e 0,8 mg.kg⁻¹ de alfa-tocoferol. As vitaminas presentes na mistura funcional de imunomoduladores são termo protegidas.

As rações foram produzidas por extrusão em pellets de 2 mm. Um misturador horizontal (Inbramaq, Ribeirão Preto, Brasil) foi usado para misturar os componentes secos, e a extrusão foi realizada em um extrusor de rosca única (MX40, Inbramaq, Ribeirão Preto, Brasil). As condições de extrusão foram previamente testadas e ajustadas para uma temperatura de 85 °C e 24% de umidade. Após a extrusão, a ração foi seca em um forno a 50 °C por 4 horas, embaladas e armazenamento a -20 °C até o uso posterior.

Tabela 1 - Formulação centesimal e composição (em matéria seca) da dieta controle e da dieta suplementada com a mistura funcional de imunomoduladores.

Ingrediente, g.kg⁻¹	Controle	Imunomodulador
Farelo de soja	485,0	485,0
Farinha de aves	115,0	115,0
Arroz quebrado	234,0	234,0
Milho	135,5	135,5
Óleo de soja	7,0	7,0
Cloreto de colina	2,0	2,0
Premix ¹	1,5	1,5
Mistura funcional de imunomoduladores ²	0,0	40,0
Composição centesimal, g.kg⁻¹		
Matéria seca	871,6	890,0
Proteína bruta ³	350,8	358,2
Extrato etéreo	55,9	52,0
Matéria mineral ³	54,3	78,6

Fonte: Elaborado pelo autor

¹Composição Premix Rovimix®. DSM: Vitamina A 5.333.000 IU.kg⁻¹; Vitamina D3 1.000.000 IU.kg⁻¹; Vitamina E 66.7 g.kg⁻¹; Vitamina K3 3.33 g.kg⁻¹; Vitamina B1 6.67 g.kg⁻¹; Vitamina B2 10 g.kg⁻¹; Vitamina B6 10 g.kg⁻¹; Vitamina B12 0.013 g.kg⁻¹; Niacina 53.33 g.kg⁻¹; Ácido pantotênico 26.67 g.kg⁻¹; Biotina 0.333 g.kg⁻¹; Ácido fólico 2.67 g.kg⁻¹; Vitamina C 100 g.kg⁻¹; Cobre 3.33 g.kg⁻¹; Ferrp 20 g.kg⁻¹; Manganês 16.67 g.kg⁻¹; Iodo 0.67 g.kg⁻¹; Cobalto 0.033 g.kg⁻¹; Zinco 26.6 g.kg⁻¹; Selênio 0.167 g.kg⁻¹. ²Composição do Rovimax®. DSM: β -glucanos 1000 g.t⁻¹. Nucleotídeos 150 g.t⁻¹. Vitamina C 1000 g.t⁻¹; Vitamina E 20 g.t⁻¹. ³Composição centesimal em matéria seca.

2.2 PEIXES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os peixes experimentais usados neste estudo foram juvenis machos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT, submetidos à inversão sexual. Esses peixes foram obtidos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI).

Para aclimatação, os peixes foram inicialmente mantidos em dois tanques de 100 litros conectados a um sistema de recirculação aquícola (RAS) por um período de 21 dias. Durante o período de aclimatação, os peixes foram alimentados com uma dieta de controle. Posteriormente, os 120 peixes foram redistribuídos aleatoriamente para as unidades experimentais, que consistiam em tanques de 100 litros, divididos em grupos de 20 peixes (peso inicial de $1,88 \text{ g} \pm 0,25 \text{ g}$, média \pm desvio padrão) por unidade experimental, resultando em dois tratamentos dietéticos e três repetições cada, totalizando seis unidades experimentais. A quantidade de ração oferecida foi pesada diariamente, e o consumo individual de ração foi registrado para cada tanque. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente quatro vezes ao dia por um período de 50 dias.

Todos os tanques estavam conectados a um sistema RAS com uma taxa de fluxo contínuo de 0,55 L/min. O sistema estava equipado com filtros mecânicos e biológicos, além de desinfecção ultravioleta. A temperatura e os níveis de oxigênio dissolvido da água foram monitorados diariamente, enquanto outros parâmetros de qualidade da água foram monitorados semanalmente. As medições foram feitas usando um oxímetro digital (para temperatura e oxigênio), um sensor multiparamétrico (para pH) e um kit colorimétrico (para amônia total, nitrito e alcalinidade). Os parâmetros de qualidade da água registrados permaneceram dentro da faixa ideal para a tilápia-do-nilo (EL-SHERIF; EL-FEKY, 2009; TRAN-DUY et al., 2008), com os seguintes valores médios \pm desvio padrão: temperatura $27,67 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,35$, oxigênio dissolvido $8,45 \text{ mg/L} \pm 0,74$, pH $7,87 \pm 0,12$, amônia total $0,14 \text{ mg/L} \pm 0,09$, nitrito $0,01 \text{ mg/L} \pm 0,00$ e alcalinidade $40 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$.

2.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Ao término do experimento de alimentação, nove animais por unidade experimental, totalizando 18 por tratamento, foram anestesiados com Eugenol Vetec® (75 mg.L^{-1}), e o sangue foi coletado por punção do vaso caudal usando uma seringa contendo solução de etilenodiaminotetraacético (EDTA a 10%) para diferentes análises hematológicas.

Uma parte do sangue foi usada para determinar o hematócrito usando o método de micro-hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). Outra alíquota do sangue foi usada para a contagem total de eritrócitos, que foi realizada em uma câmara de Neubauer após diluição (1:200) em fluido Dacie modificado (BLAXHALL; DAISLEY, 1972). A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método de cianometahemoglobina, e equações hematimétricas foram aplicadas para determinar o volume corpuscular médio (VCM), a concentração média de hemoglobina corpuscular (CMHC) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

2.4 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

Após a coleta das amostras de sangue, foi realizado um *pool* do sangue coletado de três animais, consistindo em três *pools* para cada unidade experimental, totalizando 9 amostras por tratamento, foi deixada em repouso por 1 hora. Posteriormente, o *pool* foi centrifugado a 1.400 g por 15 minutos a 4 °C para obter plasma sanguíneo, que foi armazenado a -20 °C para análises imunológicas posteriores.

A concentração total de proteína plasmática foi medida usando o kit de Proteína Total (Biotécnica, Varginha, MG, Brasil), e a concentração total de imunoglobulina ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi medida seguindo o método descrito por Amar et al. (2000).

A atividade de aglutinação plasmática foi realizada em uma microplaca com 96 poços em formato de "U". O plasma foi diluído em solução tampão fosfatada salina (PBS) na proporção de 1:1 (50 μL de PBS: 50 μL de solução de plasma) no primeiro poço. Em seguida, o plasma foi diluído em série nos outros poços na proporção de 1:2. Em seguida, 50 μL de suspensão de *Streptococcus agalactiae* S13 sorotipo Ib inativado (FACIMOTO et al., 2017) a uma concentração de 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} foi adicionado a todos os poços. A microplaca foi então incubada a 25 °C por 18 horas em uma câmara úmida. O título foi determinado como o recíproco da última diluição que mostrou aglutinação observável, onde agregados podiam ser vistos no fundo do poço a olho nu (SILVA et al., 2009).

Além disso, o título de mínima concentração inibitória (MIC) foi determinado em uma microplaca plana de 96 poços. Inicialmente, 150 μL de caldo de coração e cérebro (BHI) foi adicionado ao primeiro poço, enquanto 100 μL foi adicionado aos demais poços. Em seguida, 50 μL de plasma foi adicionado ao primeiro poço, e a diluição em série por um fator de dois foi realizada até o último poço. Posteriormente, 20 μL da suspensão bacteriana de *Streptococcus agalactiae* (1×10^8 UFC mL^{-1}) diluída em BHI foi adicionado. A microplaca foi incubada a 28

°C por 24 horas. A menor concentração inibitória foi determinada como a última diluição de plasma em que o crescimento bacteriano foi completamente inibido (SILVA et al., 2009).

2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para avaliar a integridade das células intestinais e microvilosidades, amostras do trato intestinal foram fixadas em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) com 0,2 M de sacarose. Em seguida, foram pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio por 4 horas. A desidratação foi realizada usando uma série de concentrações de acetona graduadas, e as amostras foram posteriormente embutidas em resina Spurr (SCHMIDT et al., 2010). Seções ultrafinas foram preparadas usando um ultramicrotomo (Leica, Reicheit Ultracut S, Viena, Áustria) e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Fotomicrografias foram tiradas usando um MET JEM 1011 (JEOL, Tóquio, Japão) operando a 80 kV.

2.6 ANÁLISE DE METAGENÔMICA

2.6.1 Coleta das amostras

Ao final do experimento de alimentação, três peixes de cada tanque foram anestesiados com Eugenol® (75mg.L⁻¹) e a eutanasiados por secção da medula espinhal. Posteriormente, cada peixe foi aberto assepticamente com auxílio de um bisturi esterilizado para retirada do intestino médio, e as amostras foram armazenadas individualmente em criotubos livres de ácidos ribonucleicos (RNAse) e ácidos desoxirribonucleicos (DNAse) e armazenados em nitrogênio líquido até posterior análise.

2.6.2 Extração de DNA

Para extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) das bactérias presentes no material coletado, foram utilizadas 200 mg da porção que compreendia o intestino médio dos peixes coletados (pools de cinco peixes por unidade experimental), utilizando o kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini (QIOGEN, Hilden, Alemanha, DE), seguindo-se as especificações do fornecedor. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific DE, US) e mantido em concentração acima de 100 µg µl⁻¹.

2.6.3 Amplificação da PCR

Após a extração do DNA, as amostras foram enviadas à empresa Neoprosecta® para a análise metagenômica. Para tal, foi realizada amplificação da região do gene 16S do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) das regiões preservadas V3 e V4.

2.6.4 Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR)

Para sequenciamento dos dados foi utilizado a tecnologia Illumina SBS, que marca os nucleotídeos por fluorescência quando estes se ligam a fita complementar em cada ciclo. As sequências com ruído foram removidas e as leituras representativas restantes dos clusters foram agrupadas usando o algoritmo complexo em Operational Taxonomy Units (OTUs), através do ajuste rápido de comprimento de leituras curtas (FLASH). As leituras foram agrupadas com 100% de identidade (ID) usando CD-HIT-DUP em um único arquivo. As OTUs foram coletadas usando um filtro de qualidade para garantir 97% de ID no nível da espécie. Para o sequenciamento, foi utilizado o alinhamento mínimo de 300 pb e com 100 k de leituras por amostra. As sequências foram analisadas usando o Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME).

2.6.5 Análise bioinformática e estatística

Análise bioinformática foi realizada de acordo com a metodologia de Langille e colaboradores (2013), através do programa QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) onde as UTOs criadas serão relacionadas aos seus táxons correspondentes através da ferramenta “assign_taxonomy.py” comparadas com o banco de dados Greengenes (<http://qiime.org>). Para estimar a riqueza e a diversidade bacteriana nos períodos amostrados, foi realizada uma análise de rarefação α , os índices Cobertura de Sequenciamento, Chao1 e Shannon, através da ferramenta “alpha_diversity.py”, onde foram calculados o índice Cobertura de Sequenciamento, como $C = 1 - (S / n)$, onde S é o número de OTUs exclusivos e n é o número de indivíduos na amostra, que expressa o quanto a amostra representa o ambiente, em medida relativa. O índice de diversidade de Shannon, que leva em consideração o número e a uniformidade da distribuição das espécies, o índice de riqueza Chao1, que direciona a estimativa de riqueza Chao1 para uma definição de OTU e o índice Inverse Simpson ($H = -\sum_{i=1}^s \frac{1}{pi^2} = 1s(pi \log_2 pi)$), onde s é o número de OTUs e pi é a proporção da comunidade

representada pela OTU i. O diagrama de Venn foi projetado para determinar as OTUs bacterianas únicas e aquelas compartilhadas entre os tratamentos, através do programa InteractiVenn (www.interactivenn.net). O gráfico de mapa de calor para filo foi gerado usando o Heatmapper (BABICKI et al., 2016).

3. RESULTADOS

3.1 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS

Os parâmetros hematológicos e imunológicos não foram afetados pela dieta suplementada com a mistura funcional de imunomoduladores no final do período de 50 dias de suplementação (Tabela 4).

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos e imunológicos de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados por 50 dias com dietas controle e suplementados com a mistura funcional de imunomoduladores (40 g.kg⁻¹). Os valores são apresentados como média ± desvio padrão.

Parâmetros Hematológicos	Controle	Imunomodulador	P Value
Eritrócitos (cel.mL ⁻¹)10 ⁶	1,53 ±0,10	1,65 ±0,54	0,1608
Hematócrito (%)	28,83 ±1,12	30,81 ±3,51	0,4073
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	14,95 ±7,53	16,40 ±9,6	0,7385
VCM (10 ⁻⁴ fL)	1,89 ±0,88	1,89 ±2,80	>0,9999
HCM (10 ⁻⁵ pg)	0,96 ±4,3	1,05 ±0,47	0,8159
CHCM (g dl ⁻¹)	46,27 ±15,07	57,07 ±30,38	0,6107
Parâmetros imunológicos			
Proteína total (mg.mL ⁻¹)	6,29 ±8,00	36,07 ±2,19	0,0999
Ig total (mg.mL ⁻¹)	1,39 ±10,22	16,93±2,39	0,5025
Aglutinação (Log ²)	,25 ±0,57	5,085 ±0,50	0,1318
MIC (Log ²)	,55 ±0,00	3,55 ±0,00	0,9999

Fonte: Elaborado pelo autor

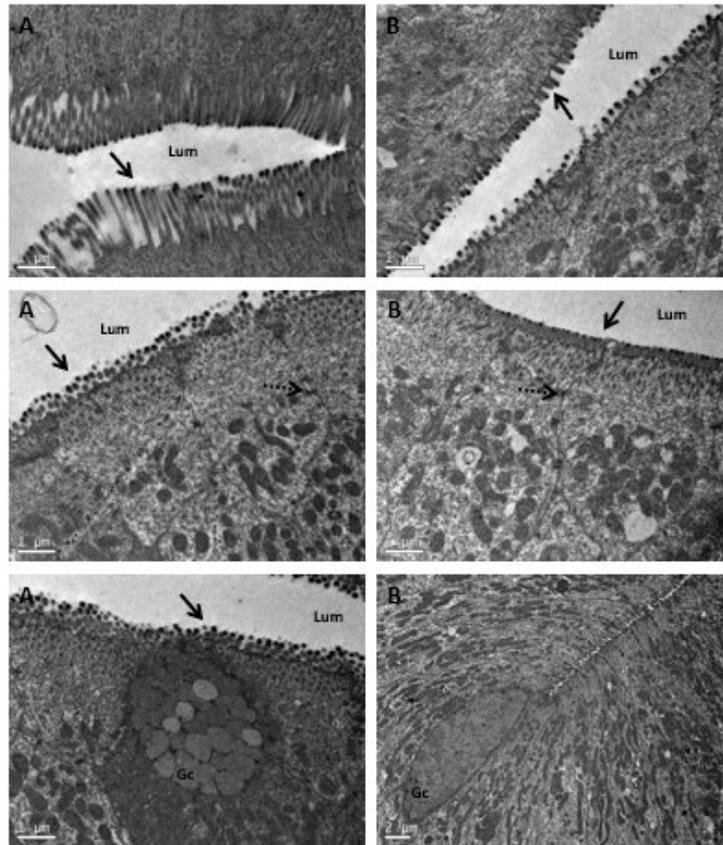
MCV: volume corpuscular médio, MCH: hemoglobina corpuscular média, MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média. MIC: concentração inibitória mínima.

3.2 MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÔNICA (TEM)

O epitélio intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo alimentadas por durante 50 dias com a dieta controle mostrou um aumento no comprimento e densidade de microvilosidades intestinais. Em contraste, aqueles suplementados com a mistura funcional de imunomodulador mostraram uma diminuição no comprimento e densidade de microvilosidades intestinais. A TEM confirmou que os animais alimentados com ambas as dietas mostraram total integridade

da mucosa intestinal. O epitélio intestinal foi encontrado intacto, com células bem definidas, não apresentando vacúolos nem espaços intercelulares (Figura 1).

Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão do epitélio intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo durante 50 dias com dietas de controle (A) e suplementadas com a mistura funcional de imunomodulador (40 g.kg^{-1}) (B). As setas mostram as microvilosidades; as setas tracejadas indicam junções comunicantes; Lum=superfície luminal; Gc: célula contendo grânulos secretores de muco típicos das células caliciformes intestinais. A barra é equivalente a $1 \mu\text{m}$.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.4 ANÁLISE METAGENÔMICA

Um total de 49532 leituras de rRNA 16S bacteriano foram geradas a partir de amostras intestinais de tilápia-do-nylo com bibliotecas de sequências de tamanho variando de 16.628 a 32.904 leituras. Com base no número total de leituras de OTU foi possível observar que todas as amostras apresentaram cobertura superior a 99,5% (Tabela 3). No total, foram identificadas 39 espécies diferentes pertencentes a 20 gêneros e 4 filos em todas as amostras.

Os índices de riqueza de Chao e de diversidade alfa (Shannon e Simpson) são mostrados na Tabela 3. Os valores dos índices de Shannon e Simpson foram mais altos nos grupos no controle. A riqueza de Chao, por sua vez, foi maior ($P < 0,05$) no grupo que recebeu suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores do que no grupo controle.

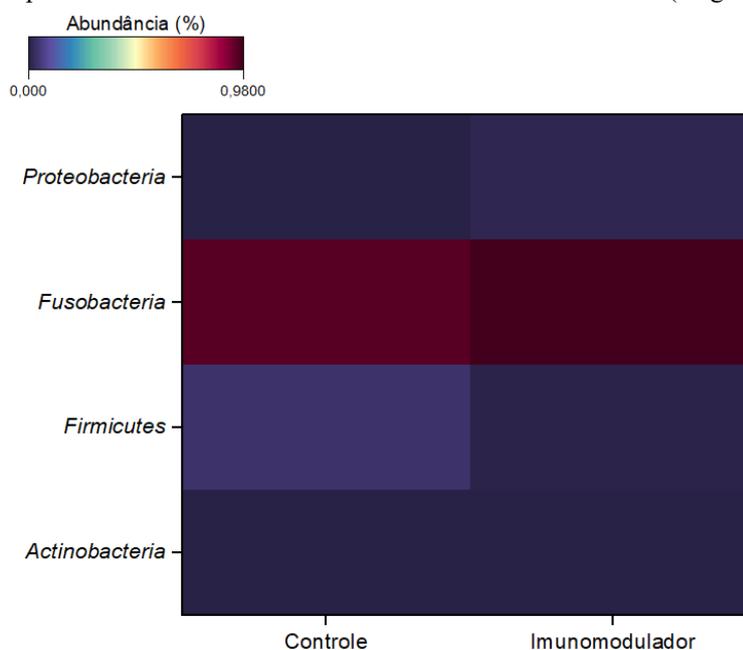
Tabela 3: *Operational Taxonomy Units* (OTU) a nível de espécie, Chao1, Shannon, Inverse Simpson e *Good's Coverage* estimadas nas amostras de microbioma intestinal de tilápia-do-nilo alimentadas por 50 dias com dietas controle e suplementadas com a mistura funcional de imunomoduladores (40 g.kg⁻¹).

Amostras	<i>Read Count</i>	OTU	Chao1	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>	<i>Good's Coverage</i>
Controle	16.628	11	21	0,21	0,089	99,98%
Imunomodulador	32904	28	32,5	0,14	0,042	99,95%

Fonte: Elaborado pelo autor

A análise do mapa de calor (Figura 2) revelou uma maior abundância do filo *Fusobacteria* nos dois grupos.

Figura 2. Mapa de calor, para o nível de filo, do microbioma intestinal tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas por 50 dias com uma dieta controle e uma dieta suplementada com a mistura funcional de imunomoduladores (40 g.kg⁻¹).

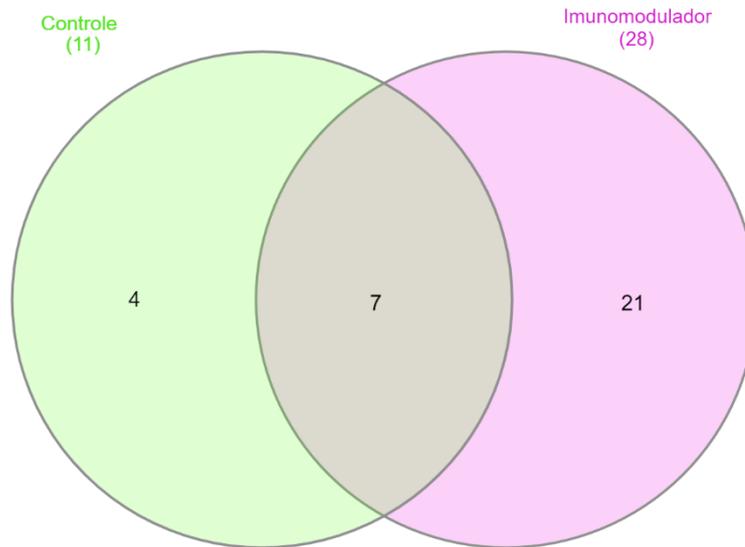


Fonte: Elaborado pelo autor

O diagrama de Venn mostrado na Figura 3 representa o número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) no nível de espécie que são exclusivas ou compartilhadas entre os tratamentos. Houve um total de 39 OTUs. O grupo controle exibiu a menor número de OTUs (11), enquanto o grupo que recebeu a suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores apresentou um maior número de OTUs (29). Sete espécies bacterianas foram compartilhadas com o grupo controle e com o grupo que recebeu a suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores (*Acinetobacter johnsonii*, *Cetobacterium somerae*,

Clostridium ruminantium, *Paenibacillus cellulosilyticus*, *Paenibacillus kobensis*, *Plesiomonas shigelloides*, e *Serratia liquefaciens*).

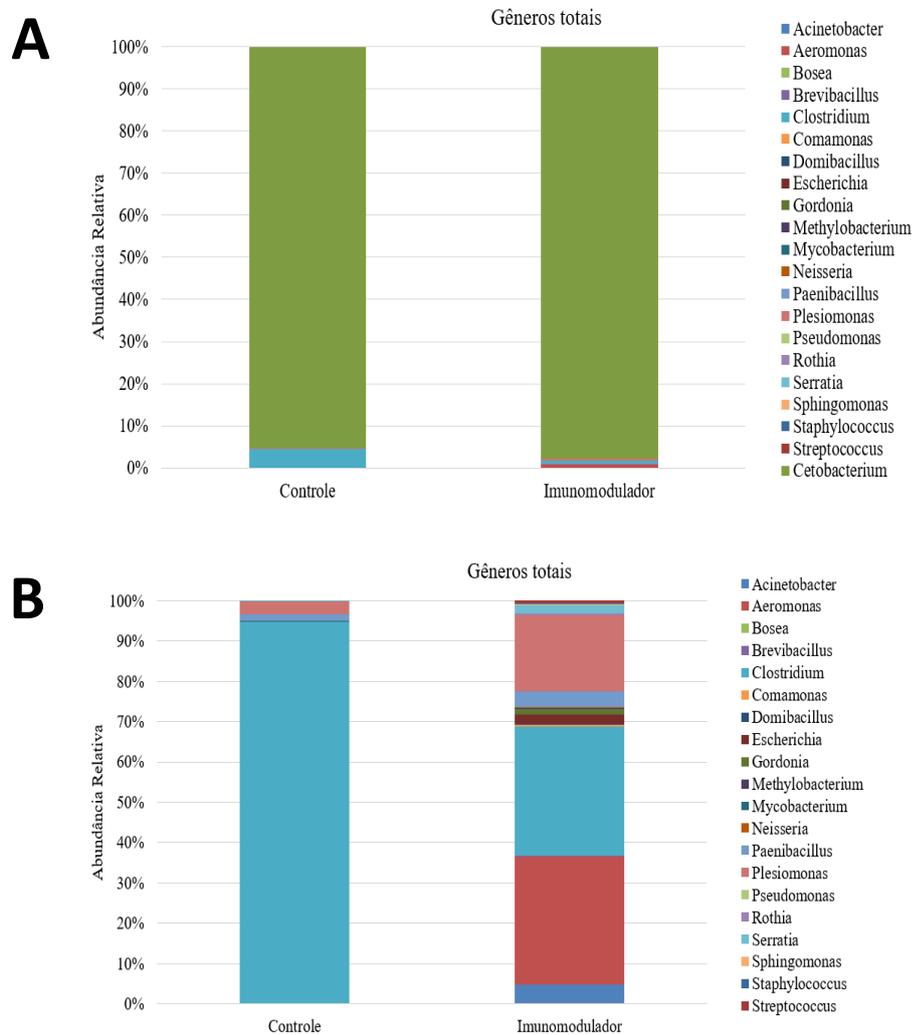
Figura 3. Representação da unidade taxonômica operacional (OTUs) a nível de espécie em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas por 50 dias com uma dieta controle e uma dieta suplementada com a mistura funcional de imunomoduladores (40 g.kg⁻¹).



Fonte: Elaborado pelo autor

O índice de diversidade mostrou que o gênero mais abundante foi *Cetobacterium* nos dois tratamentos. O grupo controle apresentou menor diversidade de espécies do que os outros grupos de tratamento (Figura 4). No grupo controle o gênero *Cetobacterium* (95%) e o *Clostridium* (4,4%) foram os gêneros mais abundantes (Figura 4). Enquanto no grupo que recebeu a suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores os gêneros mais abundantes foram *Cetobacterium* (97%), *Clostridium* (0,69%), *Aeromonas* (0,68%) e *Plesiomonas* (0,41%), essas diferenças são mais visíveis ao analisar o índice de diversidade excluindo o gênero *Cetobacterium* (Figura 4B).

Figura 4. Índice de diversidade para o nível de gênero, do microbioma intestinal tilápiado-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas por 50 dias com uma dieta controle e uma dieta suplementada com a mistura funcional de imunomoduladores (40 g.kg⁻¹). A: Índice de diversidade total. B: índice de diversidade excluindo o gênero *Cetobacterium*.



Fonte: Elaborado pelo autor

4 DISCUSSÃO

A utilização de β -glucanos, nucleotídeos, vitamina C; e vitamina E têm um impacto relevante no sistema imunológico e melhoram acentuadamente a saúde dos peixes, promovendo resistência ao estresse e, potencialmente, às doenças infecciosas (AMPHAN et al., 2019; BARROS et al., 2014; MACHADO et al., 2018; IBRAHEM et al., 2010; TRICHET et al., 2015; IZQUIERDO; BETANCOR, 2015; JIANG et al., 2019; SABER; ELHADY; ALI, 2019). No entanto, em nosso estudo o uso combinado desses imunomoduladores não melhorou os parâmetros hemato-imunológicos dos juvenis de tilápia-do-nilo após 50 dias de suplementação.

Períodos mais longos de administração de imunomoduladores têm sido associados à superestimulação e consequente exaustão do sistema imunológico (KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021; MACHUCA et al., 2022; RINGØ et al., 2011). De acordo com Koch, Oliveira & Zanuzzo (2021), períodos de suplementação com imunomoduladores acima de 45 dias são considerados longos. Além disso, doses excessivas de β -glucanos podem resultar em respostas imunológicas inadequadas, provavelmente devido à ativação de mecanismos de resposta ao estresse (ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021; SABIONI et al., 2020).

O nível de inclusão de β -glucanos que avaliamos é considerado baixo (0,004%), uma vez que Koch, Oliveira & Zanuzzo (2021) avaliaram níveis de inclusão de 0,1% em juvenis de tilápia do Nilo (por 45 dias). Sabioni et al. (2020) avaliaram a inclusão de 0,5% (por 10 dias) na dieta de juvenis de *Piaractus mesopotamicus*, e Menanteau-Ledouble et al. (2022) avaliaram níveis de inclusão de até 0,05% (por 6 semanas) na dieta de juvenis de *Oncorhynchus mykiss*.

As respostas ao estresse geralmente envolvem alterações nos sistemas de defesa (por exemplo, proteínas do choque térmico, sistemas antioxidantes, imunidade) e, mais importante, no metabolismo energético (PETITJEAN et al., 2019). Como as doses utilizadas em nosso estudo não foram excessivas, não encontramos alterações nos parâmetros hemato-imunológicos e não observamos efeitos negativos na saúde dos peixes alimentados com a dieta suplementada por 50 dias.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) confirmou que os animais alimentados com ambas as dietas apresentaram completa integridade da membrana mucosa intestinal. Uma estratégia para evitar os potenciais mecanismos de resposta ao estresse dos imunomoduladores foi adicionar as vitaminas E e C juntamente com a baixa inclusão de β -glucanos e nucleotídeos. A vitamina C e a vitamina E podem atuar como antioxidantes de maneira sinérgica. A vitamina C também foi proposta como potencialmente benéfica para estimular a resposta imunológica e reduzir os danos oxidativos nos tecidos (TRICHET et al., 2015). A vitamina E está envolvida na resposta imunológica, e uma de suas principais funções fisiológicas é proteger as membranas contra danos oxidativos (IZQUIERDO et al., 2018; WANG; QUINN, 1999).

Koch, Oliveira & Zanuzzo (2021) destacaram que níveis de inclusão de β -glucanos na dieta acima de 0,1% por períodos superiores a 45 dias poderiam ativar mecanismos de resposta ao estresse. Em nosso estudo, a inclusão de uma mistura funcional de imunomoduladores (40 kg ton⁻¹) na dieta, que contém 150 mg kg⁻¹ de nucleotídeos, 1000 mg kg⁻¹ de β -glucanos, juntamente com 1000 mg kg⁻¹ de ácido ascórbico e 20 mg kg⁻¹ de alfa-tocoferol, não causou

prejuízos a saúde dos peixes quando associados a uma dieta com uma quantidade relativamente baixa de proteína animal (11,5%) e uma quantidade maior de farelo de soja (48,5%).

Os nucleotídeos têm sido estudados como ingredientes funcionais em dietas à base de proteínas alternativas. (HOSSAIN; KOSHIO; KESTEMONT, 2020; REDA et al., 2018; RINGØ et al., 2011; SHIAU; GABAUDAN; LIN, 2015). De acordo com Bowyer et al. (2019), a inclusão de nucleotídeos na dieta pode ser usada para mitigar os efeitos prejudiciais de dietas formuladas com grandes quantidades de farelo de soja. Shiau et al. (2015) avaliaram a influência positiva de nucleotídeos em uma dieta à base de baixo teor de farinha de peixe para tilápia e relataram que nucleotídeos suplementados em 120–240 mg kg⁻¹ por 10 semanas em uma dieta com baixo teor de farinha de peixe (6%) e alto teor de farelo de soja (56%) para juvenis de tilápia híbrida melhoraram as respostas imunológicas e a sobrevivência após desafio com *Streptococcus iniae*. Entretanto, em nosso estudo não foram encontradas diferenças estatísticas entre a dieta suplementada com o complexo imunomodulador contendo nucleotídeos associado a uma dieta com 48,5% de farelo de soja, e 11,5% de farinha de aves.

Abu-Elala et al. (2021) observaram que a inclusão dietética de extratos fermentados provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*, correspondendo a níveis de inclusão de 252 mg kg⁻¹ de nucleotídeos, 940 mg kg⁻¹ de β -glucanos e 568 mg kg⁻¹ de MOS por 6 meses, foi capaz de aprimorar a nutrição, imunidade e histomorfologia intestinal de reprodutores de tilápia-do-nilo. Em nosso estudo, os parâmetros hemato-imunológicos não mostraram diferenças estatísticas, provavelmente devido às doses mais baixas de suplementação (6 mg kg⁻¹ de nucleotídeos e 40 mg kg⁻¹ de β -glucanos). Isso sugere que os peixes foram capazes de alocar seus recursos energéticos de maneira mais eficiente, sem a necessidade de despesas prolongadas na estimulação do sistema imunológico.

O microbioma intestinal dos peixes é composto por microrganismos que vivem em associação com seus hospedeiros, incluindo comunidades comensais, simbióticas ou patogênicas; desempenham funções fisiológicas importantes na saúde geral e imunidade do hospedeiro, proporcionando um ambiente rico em nutrientes para o desenvolvimento e manutenção desses microrganismos (CARBALLO et al., 2019; SOUZA et al., 2020). No presente trabalho, a cobertura superior a 99,5% das amostras indica que as comunidades microbianas foram altamente representadas na análise metagenômica, fortalecendo assim a confiabilidade dos resultados.

Embora os índices de Shannon e Simpson tenham sido maiores no grupo controle, a riqueza de Chao-1 por sua vez, foi no grupo suplementado com a mistura funcional de imunomoduladores. *Cetobacterium somerae* (uma Fusobacteriaceae) teve o maior número de

leituras e abundância proporcional em nosso estudo. O tratamento que recebeu a suplementação com a mistura funcional de imunomoduladores apresentou um maior número de OTUs (28) destas, 97,84% pertenciam ao gênero *Cetobacterium*, enquanto no grupo controle apresentou um menor número de OTUs (11), onde 95,35% das OTUs pertenciam ao gênero *Cetobacterium*.

O gênero *Cetobacterium* possui como características a produção de aminoácidos, participação em várias atividades metabólicas e síntese de vitaminas, desempenhando um papel importante na nutrição de peixes (OFEK et al., 2021; ZHANG et al., 2022). *C. somerae* é uma bactéria nativa no trato intestinal de peixes de água doce cultivados e é altamente eficiente na produção de vitamina B12, um micronutriente essencial (SALGER et al., 2020; ZHANG et al., 2022). O aumento na abundância relativa do gênero *Cetobacterium*, em especial a espécie *C. somerae* no grupo que recebeu uma dieta suplementada com uma mistura funcional de imunomoduladores pode ajudar a manutenção da saúde intestinal do peixe. Por outro lado, a abundância relativa do gênero *Cetobacterium* no grupo que recebeu a dieta suplementada com a mistura funcional de imunomoduladores determinou para que os índices de Shannon e Simpson fossem maiores no grupo controle.

Os resultados sugerem que a suplementação de dietas para peixes com uma mistura funcional de imunomoduladores, incluindo nucleotídeos e β -glucanos, juntamente com antioxidantes como as vitaminas C e E, pode melhorar a saúde intestinal, aumentar o índice de riqueza de Chao-1 mesmo em dietas com baixo teor de proteína animal e alto teor de farelo de soja. No entanto, é importante realizar mais pesquisas para entender completamente os efeitos a longo prazo e as melhores práticas de suplementação em diferentes espécies de peixes e condições de cultivo.

O potencial de ingredientes alimentares funcionais, como nucleotídeos e β -glucanos, para modular o microbioma intestinal ainda é relativamente pouco explorado e deve ser investigado mais aprofundadamente usando tecnologias modernas apropriadas. Estudos adicionais ainda são necessários, mas nosso trabalho permite avaliar a redução no uso de proteína animal na dieta, juntamente com o efeito de nucleotídeos, β -glucanos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol. Em conjunto, esses compostos podem fornecer ao organismo do peixe as ferramentas necessárias para alcançar uma saúde e crescimento ótimos.

5 CONCLUSÃO

A suplementação com nucleotídeos, β -glucanos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol em conjunto aumentou o índice de riqueza de Chao-1 e não causou alterações nos parâmetros hemato-imunológicos dos peixes, o que sugere que os peixes não precisaram mobilizar energia na manutenção de um estímulo imunológico prolongado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil, Código Financeiro 001) pelas bolsas concedidas ao primeiro autor e pelo suporte financeiro parcial; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e bolsas de pesquisa concedidas a M.L. Martins (CNPq 306635/2018-6), J.L.P. Mouriño (CNPq 301524/2017-3); à empresa DSM (Kaiseraugst, Suíça) pelo apoio financeiro a esta pesquisa; e à Dra. Débora Machado Fracalossi, do Departamento de Aquicultura da UFSC Brasil, pelo apoio na fabricação dos alimentos e análises.

REFERÊNCIAS

- ABO-AL-ELA, H.G.; EL-NAHAS, A.F.; MAHMOUD, S.; IBRAHIM, E.M. Vitamin C modulates the immunotoxic effect of 17 α -Methyltestosterone in Nile Tilapia. *Biochemistry*, v.56, p.2042-2050, 2017.
- AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH, S.; OKAMOTO, N.; WATANABE, T. Effects of dietary beta-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.*, v.66, p.1068-1075, 2000.
- AMPHAN, S.; UNAJAK, S.; PRINTRAKOON, C.; AREECHON, N. Feeding-regimen of β -glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.87, p.120-128, 2019.
- ARAMLI, M.S.; KAMANGAR, B.; NAZARI, R.M. Effects of dietary β -glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.47, p.606-610, 2015.
- BARROS, M.M.; FALCON, D.R.; ORSI, R.O. *et al.* Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol.*, v.39, p.188-195, 2014.
- BLAXHALL, P.C.; DAISLEY, K.W. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.*, v.5, p.771-781, 2018.
- BRUM, A.; CARDOSO, L.; CHAGAS, E.C. *et al.* Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, v.490, p.98-107, 2018.
- BUONOCORE, F.; SCAPIGLIATI, G. *Immune defence mechanisms in the sea bass *dicentrarchus labrax l.*, fish defenses*. [s.l.]: Science Publishers, Enfield, 2009. v.1, p.185-219.
- CARBONE, D.; FAGGIO, C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish*

Immunol., v.54, p.172-178, 2016.

CORNET, V.; KHUYEN, T.D.; MANDIKI, S.N.M. *et al.* GAS1: a new β -glucan immunostimulant candidate to increase rainbow trout (*Ocorhynchus mykiss*) resistance to bacterial infections with aeromonas salmonicida achromogenes. *Front. Immunol.*, v.12, p.1-16, 2021.

CUNNIFF, P.A. (Ed.). *Official methods of analysis of the AOAC International*. Artlington: AOAC International, 1997.

DAWOOD, M.A.O.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M.Á. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Rev. Aquac.*, v.10, p.950-974, 2017.

EID, A.E.; GHONIM, S.I. Dietary zinc requirement of fingerling *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.119, p.259-264, 1994.

ELKATATNY, N.M.; EL NAHAS, A.F.; HELAL, M.A.; FAHMY, H.A.; TANEKHY, M. The impacts of seasonal variation on the immune status of Nile tilapia larvae and their response to different immunostimulants feed additives. *Fish Shellfish Immunol.*, v.96, p.270-278, 2020.

EL-SHERIF, M.S.; EL-FEKY, A.M.I. Performance of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Effect of pH. *Int. J. Agric. Biol.*, v.11, p.297-300, 2009.

ENCARNAÇÃO, P. Functional feed additives in aquaculture feeds. in: NATES. S.F. (Ed.). *Aquafeed Formulation*. [s.l.]: Academic Press, 2015. p.217-237.

FACIMOTO, C.T.; CHIDEROLI, R.T.; GONÇALVES, D.D. *et al.* Whole-genome sequence of streptococcus agalactiae strain s13, isolated from a fish eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. *Genome Announc*, v.5, p.e00917, 2017.

FERRARI, J.E.C.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. Níveis de cobre em dietas para tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*. *Acta Sci.*, v.26, p.429-436, 2004.

GAO, J.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M. *et al.* Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance , fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese fl ounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fi sh oil. *Aquaculture*, v.422-423, p.84-90, 2014.

GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v.56, p.S1-S4, 2002.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.56, p.35-39, 1971.

IBRAHEM, M.D.; FATHI, M.; MESALHY, S.; ABD EL-ATY, A.M. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.*, v.29, p.241-246, 2010.

IZQUIERDO, M.; BETANCOR, M. Vitamin E. In: LEE, C.S.; LIM, C.; GATLIN, D.M.,

- WEBSTER, C.D. (Eds.). *Dietary nutrients, additives, and fish health*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015. p.173-193.
- JIANG, M.; MA, L.; SHAO, H. *et al.* Dietary vitamin E requirement of sub-adult genetically improved farmed tilapia strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in freshwater. *Aquac. Nutr.*, v.26, 1-9, 2019.
- LIN, Y.H.; LIN, S.M.; SHIAU, S.Y. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, v.284, 207-210, 2008.
- MACHADO, M.; AZEREDO, R.; FONTINHA, F. *et al.* Dietary methionine improves the european seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status, inflammatory response, and disease resistance. *Front. Immunol.*, v.9, p.1-17, 2018.
- MEENA, D.K.; DAS, P.; KUMAR, S. *et al.* Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem.*, v.39, p.431-457, 2013.
- MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Morphology, formation and possible function. *Ceel Tissue Res.*, v.277, p.1-10, 1994.
- MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of Labeo rohita fingerlings. *Aquaculture*, v.255, p.82-94, 2006.
- MOHAMED, M.A.; DALY, E.F.E.; AZEEM, N.A.A.E.; YOUSSEF, A.W.; HASSAN, H.M.A. Growth performance and histological changes in ileum and immune related organs of broilers fed organic acids or antibiotic growth promoter. *Int. J. Poult. Sci.*, v.13, p.602-610, 2014.
- NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E.; KINROSS, J. *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, v.336, p.1262-1267, 2012.
- NUTRIENT requirements of fish and shrimp. Washington: National Academies Press, 2011.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. *Métodos para análise hematológica em peixes*. Maringá: Eduem, 2013.
- REDDY, N.R.; SATHE, S.K. *Food phytates*. [s.l.]: CRC Press, 2002.
- RINGØ, E.; ERIK OLSEN, R.; GONZALEZ VECINO, J.L.; WADSWORTH, S. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *J. Mar. Sci. Res. Dev.*, v.2, p.1-22, 2011.
- RINGØ, E.; SONG, S.K. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquac. Nutr.*, v.22, p.4-24, 2016.
- SABER, T.M.; ELHADY, M.; ALI, H.A. Effect of dietary vitamin E on biochemical, oxidative stress and immunological parameters in Nile tilapia exposed to penoxsulam. *Afr. J. Aquat. Sci.*, v.44, p.237-245, 2019.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S. *et al.* The use of histopathological indicators to

evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery*, v.6, p.75-86, 1997.

SHIAU, S.Y.; SU, L.W. Ferric citrate is half as effective as ferrous sulfate in meeting the iron requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *J. Nutr.*, v.133, p.483-488, 2003.

SILVA, B.C.; MARTINS, M.L.; JATOBÁ, A. *et al.* Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.29, p.874-880, 2009.

SITUMORANG, M.L.; SCHRYVER, P.; DIERCKENS, K.; BOSSIER, P. Effect of poly-β-hydroxybutyrate on growth and disease resistance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. *Vet. Microbiol.*, v.182, p.44-49, 2016.

SUBRAMANIAN, S.; MACKINNON, S.L.; ROSS, N.W. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, v.148, p.256-263, 2007.

TRAN-DUY, A.; SCHRAMA, J.W.; VAN DAM, A.A.; VERRETH, J.A.J. 2008. Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.275, p.152-162, 2008.

TRICHET, V.V.; SANTIGOSA, E.; COCHIN, E.; GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on urinary excretion, In: LEE, C.S.; LIM, C.; GATLIN, D.M.; WEBSTER, C.D. (Eds.). *Dietary nutrients, additives, and fish health*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015. p.151-171.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, v.151, p.185-207, 1997.

WEBSTER, C.D.; LIM, C. Minerals. In: LEE, C.; GATLIN, D.M.; WEBSTER, C.D. (Eds.). *Dietary nutrients additives and fish health*. Hoboken: Wiley, 2015. p.195-210.

WIEGERTJES, G.F.; STET, R.J.M.; PARMENTIER, H.K.; VAN MUISWINKEL, W.B. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Dev. Comp. Immunol.*, v.20, p.365-381, 1996

4. CONCLUSÃO GERAL

A suplementação em conjunto com nucleotídeos, β -glucanos, ácido ascórbico e alfa-tocoferol otimizou o crescimento e melhorou a morfologia intestinal, resultando em uma melhor utilização de nutrientes, conversão alimentar e retenção de proteínas em juvenis de tilápia-donilo mesmo quando utilizada uma dieta com altos níveis de inclusão de farelo de soja.

A suplementação também promoveu um aumento no índice de riqueza de Chao-1. No entanto, essas intervenções não alteraram os parâmetros hemato-imunológicos dos peixes, o que sugere a ausência de um estímulo exacerbado do sistema imune, o que poderia ocasionar um esgotamento do sistema imunológico a longo prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS DA INTRODUÇÃO

- ABO-AL-ELA, H. G. et al. Vitamin C Modulates the Immunotoxic Effect of 17α -Methyltestosterone in Nile Tilapia. **Biochemistry**, v. 56, n. 14, p. 2042–2050, 2017.
- ABU-ELALA, N. M. et al. Analysis of the productivity, immunity, and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock-fed dietary fermented extracts sourced from *Saccharomyces cerevisiae* (hilyses): A field trial. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 1 mar. 2021.
- AMAL, M. N. A.; SAAD, M. Z. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. **PERTANIKA Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, p. 195–206, 1 ago. 2011.
- ARAMLI, M. S.; KAMANGAR, B.; NAZARI, R. M. Effects of dietary β -glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 47, n. 1, p. 606–610, 2015.
- ASENCIOS, O. Y. et al. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 74–79, 2016.
- BABICKI, S. et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. W147–W153, 1 abr. 2016.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 30 de 07 de agosto de 2009.**, 2009.
- BUDIÑO, F. E. L. et al. Desempenho e digestibilidade de leitões alimentados com rações contendo feno de alfafa e frutoligossacarídeo na fase inicial. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 4, p. 796–810, dez. 2015.
- BULLER, N. B. **Bacteria from Fish and other aquatic animals**. 1. ed. Oxfordshire: CABI Publishing, 2004.
- CARBALLO, C. et al. Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 92, p. 31–39, 1 set. 2019.
- CARBONE, D.; FAGGIO, C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 54, p. 172–178, 2016.
- CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.; GIOACCHINI, G. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. **Aquaculture**, v. 472, n. March, p. 144–155, 2017.
- CLERTON, P. et al. Dietary vitamin e and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: Effect on gut and on head kidney leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2001.

CORNET, V. et al. GAS1: A New β -Glucan Immunostimulant Candidate to Increase Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Resistance to Bacterial Infections With *Aeromonas salmonicida achromogenes*. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 6 jul. 2021.

COUNCIL, N. R. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

D'ABRAMO, L. R. Fulfilling the Potential of Probiotics, Prebiotics, and Enzymes as Feed Additives for Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 49, n. 3, p. 444–446, 2018.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. **β -glucans as conductors of immune symphonies. Fish and Shellfish Immunology**. Academic Press, 2008.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M. Á. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: A review. **Reviews in Aquaculture**, p. 1–25, 2017.

DELUCA, H. F. Vitamin D: its role and uses in immunology. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, p. 2579–2585, 2001.

DIMITROGLOU, A. et al. **Microbial manipulations to improve fish health and production - A Mediterranean perspective. Fish and Shellfish Immunology**. Academic Press, , 2011.

ENCARNAÇÃO, P. Functional feed additives in aquaculture feeds. Em: **Aquafeed Formulation**. [s.l.] Academic Press, 2015. p. 217–237.

ENCARNAÇÃO, P. 5 - Functional feed additives in aquaculture feeds. Em: NATES, S. F. B. T.-A. F. (Ed.). San Diego: Academic Press, 2016. p. 217–237.

GAO, J. et al. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance , fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. **Aquaculture**, v. 422–423, p. 84–90, 2014.

GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S1–S4, 2002.

HOSSAIN, M. S.; KOSHIO, S.; KESTEMONT, P. **Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture**. Wiley-Blackwell, , 1 maio 2020.

IREGUI, C. A. et al. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, n. 2, p. 205–215, 2016.

IZQUIERDO, M.; BETANCOR, M. **Vitamin E. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health**: Wiley Online Books., 5 maio 2015.

JENG, S. S. et al. Anoxia survival in common carp and crucian carp is related to high zinc concentration in tissues. **Fisheries Science**, v. 74, n. 3, p. 627–634, 2008.

KHANJANI, M. H. et al. **Biofloc: A sustainable dietary supplement, nutritional value and functional properties.** *Aquaculture* Elsevier B.V., , 15 jan. 2023.

KHANJANI, M. H.; SHARIFINIA, M.; HAJIREZAEI, S. **Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming.** *Aquaculture* Elsevier B.V., , 15 abr. 2022.

KIM, J. H.; KANG, J. C. Influence of dietary ascorbic acid on the immune responses of juvenile Korean rockfish *Sebastes Schlegelii*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 27, n. 3, p. 178–184, 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. A.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 112, p. 56–63, 1 maio 2021.

LANGILLE, M. G. I. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814–821, set. 2013.

LOVELL, T. **Nutrition and Feeding of Fish.** Boston, MA: Springer US, 1989.

MACHUCA, C. et al. **Yeast β -Glucans as Fish Immunomodulators: A Review.** *Animals* MDPI, , 1 ago. 2022.

MEENA, D. K. et al. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431–457, 2013.

MENANTEAU-LEDOUBLE, S. et al. Modulation of gut microbiota, blood metabolites, and disease resistance by dietary β -glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal Microbiome**, v. 4, n. 1, 20 nov. 2022.

MISRA, C. K. et al. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, v. 255, n. 1–4, p. 82–94, 2006.

MOURIÑO, J. L. P. et al. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 73–80, 29 jun. 2011.

MUGWANYA, M. et al. **Updating the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Tilapia Aquaculture as Leading Candidates for Food Sustainability: a Review.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins* Springer, , 1 fev. 2022.

MUSHARRAF, M.; KHAN, M. A. Dietary magnesium requirement for fingerlings of Rohu (*Labeo rohita*). v. 496, n. July, p. 96–104, 2018.

OFEK, T. et al. Comparative Study of Intestinal Microbiota Composition of Six Edible Fish Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 7 dez. 2021.

PILARSKI, F. et al. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 25–29, 2017.

PUANGKAEW, J. et al. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, n. 1, p. 25–39, 2004.

RINGØ, E. et al. Use of Immunostimulants and Nucleotides in Aquaculture: A Review. **Journal of Marine Science: Research & Development**, v. 02, n. 01, p. 1–22, 2011.

RINGØ, E.; SONG, S. K. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 4–24, 2016.

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

RODRIGUES, M. V. et al. **Development of Fish Immunity and the Role of β -Glucan in Immune Responses**. **MoleculesMDPI**, , 1 nov. 2020.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1–2, p. 63–92, 1999.

SALGER, S. A. et al. Enhanced biodiversity of gut flora and feed efficiency in pond cultured tilapia under reduced frequency feeding strategies. **PLoS ONE**, v. 15, n. 7 July, 1 jul. 2020.

SALVADOR, R. et al. Isolamento de *Streptococcus spp.* de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 35, 10 maio 2003.

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.

SENADHEERA, S. D. et al. Effects of dietary iron supplementation on growth performance , fatty acid composition and fatty acid metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed vegetable oil based diets. **Aquaculture**, v. 342–343, p. 80–88, 2012.

SHIAU, S.-Y.; LIN, Y.-H. **Vitamins (Excluding C and E). Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health**: Wiley Online Books., 5 maio 2015.

SOUZA, F. P. DE et al. Effect of β -glucan in water on growth performance, blood status and intestinal microbiota in tilapia under hypoxia. **Aquaculture Reports**, v. 17, 1 jul. 2020.

TACON, A. G. J.; METIAN, M.; MCNEVIN, A. A. **Future Feeds: Suggested Guidelines for Sustainable Development**. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture** Taylor and Francis Ltd., , 2022.

TAYLOR, P.; HEDRICK, R. P. Journal of Aquatic Animal Health Relationships of the Host , Pathogen , and Environment : Implications for Diseases of Cultured and Wild Fish Populations. n. September 2014, p. 37–41, 2011.

THOMPSON, I. et al. The Effect of Dietary Vitamin-a and Astaxanthin on the Immunocompetence of Rainbow Trout. **Aquaculture**, v. 133, n. 2, p. 91–102, 1995.

TRICHET, V. V. et al. **The Effect of Vitamin C on Fish Health. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health**: Wiley Online Books., 5 maio 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch7>>

TUCKER, C. S.; HARGREAVES, J. A. **Environmental Best Management Practices for Aquaculture** Edited by. [s.l: s.n.].

VALLEJOS-VIDAL, E. et al. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 56, p. 34–69, 2016.

VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The effects of β - Glucan on fish immunity. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 10, p. 580–588, 2013.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. **Dietary modulation of immune function by β -glucans**. **Physiology and Behavior**. Elsevier Inc., 23 maio 2008.

WANG, X.; QUINN, P. J. Vitamin E and its function in membranes. v. 38, p. 309–336, 1999.

WATANABE, T. Trace minerals in fish nutrition. v. 151, p. 185–207, 1997.

WEBSTER, C. D.; LIM, C. **Minerals. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health**: Wiley Online Books., 5 maio 2015.

YANG, Q. et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of the elongation factor Tu against *Streptococcus agalactiae* in tilapia. **Aquaculture**, v. 492, p. 184–189, 2018.

YI, M. et al. An investigation into the effects of *Streptococcus agalactiae* on the 5-HT system and the behavior of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, v. 15, n. September, p. 100232, 2019.

ZHANG, D. et al. An effective live attenuated vaccine against *Streptococcus agalactiae* infection in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, 2019.

ZHANG, Z. et al. Characterization of the core gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication of a putative novel *Cetobacterium* species and analysis of its potential function on nutrition. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 12, 1 dez. 2022.