

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MADAY PRISCILA PIVA DEON

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR FRUTOOLIGOSSACARÍDEO EM
JUVENIS DE PACU (*PIARACTUS MESOPOTAMICUS*)**

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS
2019

MADAY PRISCILA PIVA DEON

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR FRUTOOLIGOSSACARÍDEO EM
JUVENIS DE PACU (*PIARACTUS MESOPOTAMICUS*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia – Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado

DOIS VIZINHOS

2019

D418m Deon, Maday Priscila Piva.

Modulação da resposta imune por frutooligossacarídeo em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). / Maday Priscila Piva Deon – Dois Vizinhos, 2019.

41f.: il.

Orientador: Prof^o Dr. Ricardo Yuji Sado.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Dois Vizinhos, 2019.

Bibliografia p.34-41.

1. Pacu (Peixe). 2. Aquicultura. 3. Sistema imunológico. I. Sado, Ricardo Yuji, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. III. Título

CDD:639.8

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral Benin CRB: 9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 106

**Modulação da resposta imune por frutooligossacarídeo em juvenis de pacu
(Piaractus mesopotamicus)**

Maday Priscila Piva Deon

Dissertação apresentada às oito horas do dia quinze de fevereiro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, Linha de Pesquisa – Produção e Nutrição Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho
.....

Banca examinadora:

Dr. Ricardo Yuji Sado

UTFPR - DV

Dra. Patrícia Rossi

UTFPR - DV

Dra. Álvaro José de Almeida Bicudo

UFPR-Setor Palotina

Coordenador do PPGZO

Assinatura e carimbo

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

À minha família, dedico!

AGRADECIMENTO

Deus, obrigada! Obrigada por possibilitar conquistas. Cada aprendizado, cada abdicção, cada dificuldade tem um propósito. Todos os dias já vividos por mim foram os degraus para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por manter em mim a resistência que nem mesmo eu sabia que teria.

Agradeço grandemente ao meu Orientador, Professor Dr. Ricardo Yuji Sado, por me ensinar, por me cobrar, por me permitir e por ter confiado um trabalho a mim. Muito obrigada!

Walter, Marilei, Marlon, Murilo, Ursula. Minha família. MUITO OBRIGADA! A cada um de vocês eu dedico essa conquista, que foi nossa. Nossa alegria mais uma vez esta sendo compartilhada entre todos nós. Assim como tudo! Por todo apoio, suporte, conversas... Compreensão! Dos dias que mais lembro da minha vida, vocês estão em todos. E nesse, não poderia ser diferente. Muito obrigada por tudo!

Agradeço de todo meu coração ao meu namorado, Gabriel Kyoshi, por tudo. Sem você, o curso desse trabalho seria muito diferente. Você me deu o suporte necessário, contribuiu com seu trabalho, seu esforço, sua dedicação, sua responsabilidade. Mas, mais que isso. Contribuiu pessoalmente comigo. Contribuiu durante todo o período experimental, que foi o mais complicado pra mim. Foi necessário muita paciência e compreensão para entender os meus dias mais difíceis. Que algum dia eu possa retribuir da melhor forma tudo que você fez e faz por mim! MUITO OBRIGADA!

Agradeço aos colegas da UNEPE de Piscicultura pelas colaborações.

Muito obrigada ao Dr. Cleverson de Sousa pelas contribuições com a análise estatística dos dados.

Aos amigos, colegas de mestrado, pelos períodos de aula, conversas, reclamações, dias perdidos, dias reclamados, dias trabalhados. Muito obrigada!

A cada um que, de forma direta ou indireta, tenha passado pela minha vida durante o mestrado e tenha participado de alguma forma. Uma palavra, um gesto, uma ajuda. Que sejamos recompensados por tudo!

Ao Programa de Pós- Graduação em Zootecnia, a UTFPR-DV, aos professores do mestrado, funcionários e demais profissionais que auxiliaram a realização desse estudo e do aprimoramento de tantos alunos da Pós-Graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa;

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Deon, Maday Priscila Piva. Modulação da resposta imune por frutooligossacarídeo em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2019. N° xx. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná). Dois Vizinhos, 2019.

Intensificar a produção aquícola permite o surgimento de condições estressantes, debilitando o sistema imunológico dos peixes. Uma alternativa para evitar tais danos, e conter o uso de quimioterápicos são os imunoestimulantes. Desta forma, objetivou-se avaliar a modulação da resposta imune e crescimento de juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) alimentados com frutooligossacarídeos. Cento e vinte animais ($49,25 \pm 13,77$ g) foram distribuídos aleatoriamente em 12 aquários (60L; 10 peixes/caixa) e alimentados por sessenta dias com ração (PB 32%) contendo níveis crescentes de frutooligossacarídeo (FOS), (0,0%, 0,2% e 0,4%) em um delineamento inteiramente casualizado (n=4). Ao final do período experimental, os peixes alimentados com dieta contendo 0,2% de FOS apresentaram maior (P <0,05) contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, bem como influência sobre os o volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) (P <0,05). Embora tenha alterado tais parâmetros, o frutooligossacarídeo não apresentou capacidade imunomodulatória nas demais variáveis analisadas, não sendo considerado um modulador da resposta imune nas condições testadas.

Palavras-chave: frutooligossacarídeo. imunoestimulantes. *Piaractus mesopotamicus*. prebióticos.

ABSTRACT

Deon, Maday Priscila Piva. Modulation of the fructooligosaccharide immune response in pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*). 2019. N^o. xx. Dissertation (Master 's Degree in Zootechny - Graduate Program in Zootechnics, Federal Technological University of Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

Intensifying aquaculture production allows the development of stressful conditions, weakening the immune system of fish. An alternative to the use of chemical and natural substances is immunostimulants. Thus, a modulation of the immune response and the growth of pacu juveniles (*P. mesopotamicus*) fed with fructooligosaccharides were objectified. One hundred and five animals ($49.25 \pm 13.77\text{g}$) were randomly distributed in 12 aquariums (60L; 10 fish / box) and fed for sixty days with feed (PB 32%) containing fructooligosaccharide (FOS) (0.0%, 0.2% and 0.4%) in a completely randomized design ($n = 4$). At the end of the experimental period, fish fed with 0.2% of FOS showed a higher total count of erythrocytes, leucocytes and total thrombocytes, as well as influence on mean corpuscular volume (MCV) and corpuscular mean hemoglobin (MHC) ($P < 0,05$). Although it has altered these parameters, the fructooligosaccharide had no effect on the leukocyte activity, being considered a modulator of the immune response under the conditions tested.

Keywords: fructooligosaccharide. immunostimulants. *Piaractus mesopotamicus*. prebiotics.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Médias e desvio padrão (\pm DP) da temperatura (T), oxigênio dissolvido (O_2D), pH e amônia tóxica (NH_3) monitorados diariamente durante 60 dias..... 21
- Tabela 2-** Níveis de garantia e composição básica das dietas experimentais utilizadas para o tratamento de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotmius*)..... 20
- Tabela 3-** Médias e desvio padrão (\pm DP) de consumo total (CT) por tratamento, ganho de peso médio (GPM) por tratamento, índice de conversão alimentar (ICA) por tratamento, taxa de crescimento específico (TCE) por tratamento e fator de condição (K) por tratamento de pacus (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta..... 24
- Tabela 4-** Médias e desvio padrão (\pm DP) do hematócrito (Ht), proteína total sérica (PTS) e concentração de hemoglobina (Hb) de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeos (FOS) na dieta 25
- Tabela 5-** Médias e desvio padrão (\pm DP) da concentração de lisozima sérica (LS), lisozima no muco (LM) e burst oxidativo de juvenis de pacus (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta.....27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Ilustração representativa do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) 19
- Figura 2-** Contagem total dos eritrócitos em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta. Diferentes letras acima de cada barra denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 26
- Figura 3-** Contagem total de leucócitos e trombócitos em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 27
- Figura 4-** Variáveis hematimétricas do pacu (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Aspectos gerais de saúde nos peixes	14
2.2 Imunoestimulantes	15
2.2.1 Frutooligossacarídeo (FOS)	16
2.3 Modulação da resposta imune	17
2.4 Modelo biológico experimental	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Arranjo experimental.....	20
3.2 Parâmetros de qualidade da água.....	20
3.3 Dietas	20
3.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos	22
3.5 Avaliação dos parâmetros imunológicos	24
3.6 Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS	25
4.1 Desempenho zootécnico.....	25
4.2 Parâmetros hematológicos	25
4.3 Parâmetros imunológicos.....	28
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

A produção aquícola mundial é o setor que mais cresce dentre todos os setores de produção de alimentos de origem animal. Segundo relatório sobre o estado da Pesca e da Aquicultura mundial (FAO2018), a produção aquícola global em 2016 foi de 110,2 milhões de toneladas. O consumo mundial per capita em 2015 foi de 20,2 kg de peixe, estimando um crescimento para 20,5 kg até o ano de 2017 (FAO, 2018).

A piscicultura brasileira produziu em 2017, 691.700 toneladas de peixes cultivados, segundo o anuário da Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXEBR, 2018), liderada pelo estado do Paraná, com produção de 112 mil toneladas. Tal cenário reflete o grande potencial aquícola brasileiro (IBGE, 2016) atrelado a grandes investimentos na área e intensificação dos sistemas de cultivo, resultado de avanços científicos e tecnológicos (PEIXEBR, 2018). No entanto, altas densidades de estocagem, manejos constantes e qualidade da água de cultivo são alguns dos principais fatores que prejudicam a sanidade dos peixes e tornam esses animais predispostos a surtos de doenças, em consequência da queda da imunidade (GARCIA et al., 2013).

Como a principal finalidade do pescado produzido é o consumo humano, faz-se necessária uma alternativa ao uso de antibióticos, que por muitas vezes são ministrados aos animais como agentes profiláticos e terapêuticos ou, em subdosagens, como promotores de crescimento, podendo causar resistência bacteriana, poluição ambiental (CABELLO, 2006) e danos à saúde pública (SAMUELSEN e BERGH, 2004). Neste contexto, substâncias com capacidade imunoestimulante têm sido empregadas na alimentação dos peixes, minimizando assim, o efeito de agentes estressores, melhorando a qualidade do ambiente aquático, a condição fisiológica animal, bem como fazendo uso das Boas Práticas de Cultivo à produção de alimentos designados a população humana (BOYD e QUEIROZ, 2004). Dentre essas alternativas, os probióticos e prebióticos vêm ganhando atenção especial (LIMA et al., 2009).

O frutooligossacarídeo é um prebiótico de ocorrência natural em vegetais, cereais e frutas (SILVA et al., 2007; SANTOS; CANÇADO, 2009), que vem resultando em melhorias na resposta imune, sobrevivência e também no crescimento de peixes graças a sua capacidade de chegar intacto ao intestino sem ser digerido, fornecendo substrato à microbiota natural (ZHOU et al., 2010).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) pode ser encontrado nas Bacias dos Rios Paraná, Paraguai e Uruguai (GODOY, 1975). É um Characiforme de carne branca, sendo considerado

ótimo para o consumo humano (SAMPAIO-OLIVEIRA; CONTE; CYRINO, 2004), e também muito produzido devido a sua rusticidade, hábito alimentar onívoro e boa adaptabilidade à alimentação artificial (ração) (NUNES et al., 2013), carne saborosa e boa taxa de crescimento (JOMORI et al., 2003), o que desencadeou uma intensificação na sua produção, propiciando condições estressantes e favorecendo o acometimento por doenças oportunistas que podem afetar negativamente seu desempenho zootécnico (URBINATI E CARNEIRO, 2004).

Com o objetivo de avaliar a modulação da resposta imune por frutooligossacarídeo em juvenis de pacu e seu potencial como substituto aos antibióticos na produção intensiva de peixes, foram adicionadas diferentes concentrações de FOS na ração ofertada aos animais duas vezes ao dia, por sessenta dias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais de saúde nos peixes

Em consequência do aumento no consumo de peixes, a cadeia produtiva teve de se adaptar ao mercado consumidor, intensificando os sistemas de produção, submetendo os animais a diversos estressores; O resultado do somatório desses fatores pode afetar negativamente o sistema imunológico e a saúde dos peixes, acarretando prejuízos à produção (DAVIS et al., 2002).

Assim, modular o sistema imune dos peixes que estão confinados e propensos ao estresse é uma alternativa eficaz para manter a integridade física e imunológica (DÜGENCI et al., 2003).Dentre os principais microrganismos causadores de enfermidades com importância econômica, as bactérias patogênicas recebem atenção especial, pois provocam atrasos no desenvolvimento, elevadas taxas de mortalidade, limitando a atividade (SUHET et al., 2011). Os antibióticos são utilizados não apenas de forma terapêutica, mas também como agentes profiláticos, e, na maioria das vezes, de forma indiscriminada (SCHMIDT et al., 2000) o que potencializa a resistência bacteriana a essas substâncias, podendo deixar resíduos na carne dos peixes, além de comprometer o meio ambiente (RHODES et al., 2000, LEVY; MARSHALL, 2004).

Em razão disso, desde 2006 a União Europeia proibiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento na produção animal, restringindo seu uso apenas para fins terapêuticos (MISSOTTEN et al., 2007), tornando necessária a inserção de produtos profiláticos, que não acarretassem danos à saúde animal, humana e nem ao meio ambiente.

Entretanto, era necessário que fossem capazes de modular o sistema imunológico e desempenho, sem maiores perdas econômicas (SAKAI, 1999). Dentre esses produtos, os probióticos, prebióticos, extratos de plantas e animais (quitina e quitosana), substâncias químicas sintéticas e os fatores nutricionais, como as vitaminas, desempenham de forma efetiva o papel de estimulantes do sistema imunológico.

2.2 Imunoestimulantes

Imunoestimulantes são substâncias químicas, sintéticas ou biológicas, capazes de promover melhora na resistência do animal frente a doenças infecciosas, agindo no sistema imune inespecífico, por meio do aumento da atividade fagocítica e bactericida das células de defesa, ou por meio da atuação no sistema imune específico, quando administrado em conjunto com vacinas. O uso de compostos com capacidade de estimular o sistema imune dos peixes é um meio adequado de promover resistência frente a agentes patogênicos (BRICKNELL; DALMO, 2005; SAKAI, 1999).

Os imunoestimulantes utilizados na criação de peixes podem ser classificados conforme sua composição: extratos de plantas, animais ou hormônios, compostos químicos, adjuvantes e fatores nutricionais bem como derivados de microrganismos, denominados probióticos e prebióticos (SAKAI, 1999).

O termo prebiótico pode ser definido como um ingrediente não digerível por enzimas, sais e ácidos no processo digestivo, mas seletivamente fermentado por microrganismos do trato gastrointestinal, que afeta benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e / ou a atividade de um número de microrganismos benéficos, possibilitando a colonização do trato gastrointestinal e melhorias na saúde do hospedeiro (GATLIN et al., 2006).

Melhorias no sistema imunológico, desempenho produtivo, melhor utilização de alimentos bem como prevenção e resistência contra patógenos são algumas das principais razões para se incluir prebióticos na aquicultura (AKRAMI et al., 2013; GUERREIRO et al., 2014; MAI et al., 2010; SONG et al., 2014).

Os prebióticos usados como imunoestimulantes na aquicultura podem ser derivados de microrganismos, como os beta-glucanos (VETVICKA; VANUCCI, SIMA, 2013) e os mananoligossacarídeos (TORRECILLAS; MONTERO; IZQUIERDO, 2014), derivados de produtos animais, como a quitina e quitosana (SHANTHI MARI et al., 2014), extratos vegetais, como Aloe vera (GABRIEL et al., 2015), alho (NYA E AUSTIN, 2011), bem como produtos de diferentes origens, como o levamisol (LI et al., 2006) que é um composto

sintético de ação anti-helmíntica, por exemplo. Frutooligossacarídeo (FOS), mananoligossacarídeo (MOS), galactooligossacarídeo (GOS) e xilooligossacarídeo (XOS) são também alguns dos prebióticos utilizados em peixes (ZHANG et al., 2014; LI et al., 2007; MIANDARE et al., 2016; HOSEINIFAR et al., 2014).

O mecanismo de ação que os prebióticos possuem para estimular e/ou modular as respostas fisiológicas dos peixes ainda é um tanto quanto simplificado para compreender e relacionar intimamente todos os resultados. A ingestão de prebióticos propicia, no intestino do hospedeiro, a produção de um complexo de carboidratos capaz de agir como substrato para fermentação e desenvolvimento das bactérias benéficas desejáveis na microbiota do animal ou ainda aderindo as bactérias patogênicas, impedindo que essas se liguem ao epitélio intestinal (RINGØ et al., 2010; HOSEINIFAR et al., 2014). Ao impedir tais bactérias, os nutrientes são aproveitados pelo hospedeiro, pois não existem injúrias no epitélio intestinal, mantendo a integridade das vilosidades e melhorando a saúde do mesmo (SAAD, 2006).

Outro mecanismo de ação de prebióticos, especificamente os mananoligossacarídeos (MOS) é através da alta afinidade ligante dos mesmos, oferecendo assim um sítio competitivo às bactérias patogênicas, que apresentam as fímbrias tipo I, específicas para oligossacarídeos como o MOS. Desta forma, ao se ligarem ao mananoligossacarídeo, elas não ocupam os sítios de adesão dos enterócitos, resultando na eliminação das bactérias junto ao quimo alimentar, diminuindo a fixação de patógenos à mucosa intestinal, mantendo-a íntegra e resultando em melhorias na saúde intestinal animal (NEWMANN, 1994)

2.2.1 Frutooligossacarídeo (FOS)

Os frutooligossacarídeos são comumente utilizados na alimentação humana, introduzidos, por exemplo, em bebidas lácteas e leites fermentados (PUPIN, 2002) proporcionando melhorias na saúde e no trato gastrointestinal, podendo também ser utilizados na dieta de animais, como aditivos alimentares para suínos e aves domésticas (PASSOS et al., 2003) e em rações de cães (SWANSON et al., 2002). Ocorrendo naturalmente em vegetais, cereais e frutas, tais como cebola, alho, alcachofra, chicória, batata yacon, trigo, centeio, banana (SILVA et al., 2007; SANTOS; CANÇADO, 2009).

Os FOS são formados por oligômeros de frutose, que são compostos de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4), onde as unidades de frutose (F) são ligadas na posição $\beta(2\rightarrow1)$ da sacarose, diferenciando-o assim de outros oligômeros (YUN, 1996). Por possuírem essa ligação, apresentam resistência à digestão (FAGUNDES; COSTA,

2003), alcançando o intestino intacto e fornecendo substrato para a microbiota (ROBERFROID, 1996).

Na aquicultura, o frutooligossacarídeo vem sendo estudado e utilizado por diversos autores (AI et al., 2011; PICCOLO et al., 2011; ZHANG et al., 2013; LI et al., 2008) e, pelos resultados obtidos, pode ser considerado promissor, por promover melhora na resposta imune, crescimento e sobrevivência de peixes (ZHOU et al., 2010; GUERREIRO et al., 2015; ZHANG et al., 2014). Pode conservar e promover o crescimento seletivo e a sobrevivência de microrganismos do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, bactérias benéficas ao trato gastrointestinal (TGI) (RINGØ et al., 2010), além de possuir a capacidade de atuar sobre parâmetros hematológicos e imunológicos (SOLEIMANI et al., 2012; HE et al., 2003; ZHOU et al., 2010; AI et al., 2011; HOSEINIFAR et al., 2011), e na integridade a ultraestrutura da mucosa intestinal, aumentando a área de absorção (SOLEIMANI et al., 2012; WU et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

2.3 Modulação da resposta imune

O sistema imune dos peixes é classificado de duas formas distintas: o sistema imune inato, ou não específico, e o sistema imune específico ou de memória. Considerado a primeira defesa orgânica do animal contra patógenos, o sistema imune inato não necessita de um contato prévio com o agente etiológico, promovendo respostas imediatas ao contato, pois seus constituintes já estão dispostos e com total funcionalidade para agir. Já o sistema específico se desenvolve mais tardiamente e a partir do estabelecimento do antígeno (MAGNADÓTTIR, 2006; RAUTA et al., 2012; SECOMBES; WANG, 2012).

Subdividindo o sistema imune inato há o tipo humoral (substâncias solúveis) e o celular. Entretanto, a primeira linha de defesa orgânica dos peixes é o tegumento, constituído de muco e pele, sendo considerada uma barreira química e física contra invasores (ELLIS, 1999). Caso os microrganismos atravessem essa barreira, os componentes humorais e celulares agem de forma direcionada. O humoral é constituído por mediadores químicos solúveis presentes no soro sanguíneo como as enzimas microbianas, o sistema complemento, proteína C reativa e interferons (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014).

Constituído por um conjunto de proteínas que agem em uma cascata de reações enzimáticas, o sistema complemento participa de forma efetiva contra invasores bacterianos. É considerado um dos principais meios de combate a esses microrganismos, bem como de

processos inflamatórios, por meio de opsonização e quimiotaxia, atraindo células fagocíticas ao local da injúria (SECOMBES, 1996).

A lisozima, importante enzima que age contra bactérias gram-positivas e também gram-negativas, é produzida pelos leucócitos e está distribuída em vários fluídos corporais, como soro e muco (PALAKSHA et al., 2008). Apresenta atividade lítica sobre a membrana dessas bactérias, desta forma, destrói o patógeno e age como um importante meio de debelar os microrganismos de forma imediata (PAULSEN et al., 2003).

O sistema imune celular inato, como o próprio nome sugere, é formado por células de defesa que possuem potencial fagocitário (KANTARI et al., 2008), sendo basicamente os monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos e células citotóxicas (SECOMBES, 1996). Entretanto, estas células não estão relacionadas apenas ao sistema imune inato dos peixes, mas também com a parte específica de defesa agindo como células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T, que liberam citocinas e estimulam a fagocitose dos patógenos (ELLIS, 2001).

Os anticorpos compõem o mecanismo de defesa adquirida humoral, podendo desencadear a fagocitose ao se ligarem com os microrganismos, bem como promover a neutralização ou a opsonização do patógeno, além de poder ativar o sistema complemento e a citotoxicidade mediada por células (ELLIS, 2001). Apesar de haver divisão e subdivisões nos sistemas de defesa orgânica dos peixes, um complementa o outro (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014).

Embora haja essa proteção orgânica, um conjunto de mecanismos para potencializar tal sistema deve ser levado em consideração. A lisozima, imunoglobulinas e componentes do sistema complemento podem ser transmitidas da mãe para a prole (ZHANG; WANG; WANG, 2013), conferindo resistência ao ambiente hostil em que estão inseridos, visto que seu próprio sistema imune ainda não está em completa maturação e funcionalidade. A higiene das instalações e boas práticas de manejo são ponto-chave na cadeia produtiva do pescado desde as fases iniciais até a final.

As vacinas também conferem aos peixes uma proteção importante contra patógenos, porém, as desvantagens da vacinação, como manuseio individual, estresse, custos, ou, em casos de vacinação oral e banhos de imersão, a incerteza da abrangência do fármaco ou sua degradação, podem ser riscos fatais, além de ser uma estratégia utilizada em períodos mais avançados do cultivo (SECOMBES, 2008).

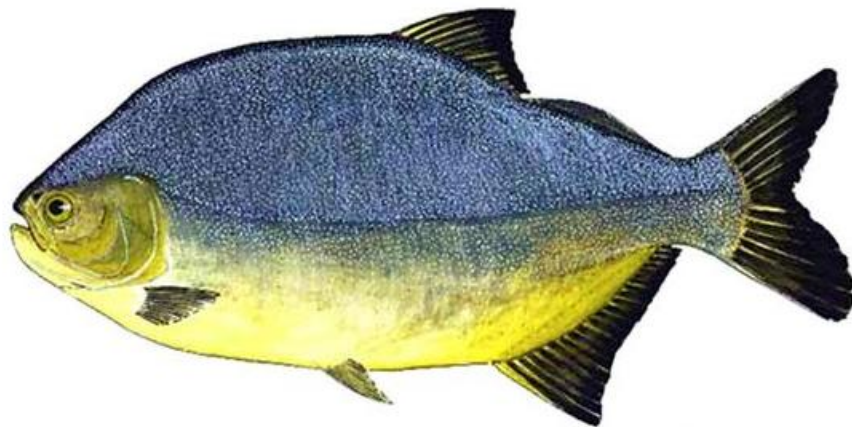
Nesse contexto, a adição de imunostimulantes na dieta desses animais é um método para proteger os peixes desde as fases iniciais, que são as mais suscetíveis, até a forma adulta, modulando seu sistema imune frente às adversidades presentes em sistemas de produção.

2.4 Modelo biológico experimental

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (figura 1), espécie descrita por Holmberg em 1887 (BRITSKI et al., 2007), pertence à família Characidae, com distribuição no Pantanal e na Bacia do Prata (GODOY, 1975), na qual se encontram as bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, que abrangem o Brasil, Uruguai, Bolívia, Paraguai e Argentina.

É um peixe que apresenta boa adaptação ao clima das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Possui hábito alimentar onívoro (URBINATI et al., 2010), mas quando criado em cativeiro apresenta adaptabilidade a ração. Tem boa aceitação no mercado consumidor devido à qualidade de seu filé cor, textura e sabor (JOMORI et al 2003; BORGES et al 2013) além da alta taxa de crescimento, rusticidade e adaptabilidade em distintos sistemas de produção (VALLADÃO et al., 2018) bem como apreciação para pesca esportiva (TAVARES-DIAS; MORAIS, 2010).

Figura 1- Ilustração representativa do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)



Fonte: (<https://www.pinterest.com.mx/pin/572449802626374953/>)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Arranjo experimental

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UTFPR e aprovado (Protocolo nº 2017-021).

Exemplares de pacu adquiridos em piscicultura comercial foram mantidos nas instalações da unidade de ensino e pesquisa – UNEPE PISCICULTURA da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR Campus Dois Vizinhos. Antes do início do experimento, os peixes passaram por um período de 15 dias de aclimação ao ambiente e foram alimentados com duas refeições diárias (09h00m e 17h00m) até aparente saciedade com a dieta do tratamento controle. Para início do experimento, os peixes foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (1:10.000), pesados, separados em lotes homogêneos de 10 peixes e distribuídos em 12 aquários de vidro (60L). Os aquários eram dotados de um sistema fechado de recirculação de água com filtragem biológica, aeração suplementar controle de temperatura. O experimento foi arranjado em um delineamento inteiramente casualizado com três níveis de inclusão (0,0; 0,2 e 0,4 %) com frutooligossacarídeo, com quatro repetições para cada tratamento. Os peixes eram alimentados duas vezes ao dia (09h00m e 17h00m) até aparente saciedade durante 60 dias. Os parâmetros de qualidade da água (temperatura, pH, amônia total e oxigênio dissolvido) foram analisados diariamente durante todo o período experimental.

3.2 Parâmetros de qualidade da água

Na tabela 1 estão demonstrados os valores médios das análises diárias para temperatura, oxigênio dissolvido, pH e amônia total. Segundo Urbinati e Golçalves (2005) os parâmetros de qualidade se encontravam dentro do preconizado para a espécie.

Tabela 1- Médias e desvio padrão (\pm DP) da temperatura (T), oxigênio dissolvido (O_2D), pH e amônia tóxica (NH_3) monitorados diariamente durante 60 dias

T (°C)	O_2D (mg/L)	pH	NH_3
26,94 \pm 2,80	6,34 \pm 0,37	6,13 \pm 0,11	<0,05

3.3 Dietas

A ração (Tabela 2) cedida pela empresa Anhambi Alimentos (Itapejara D'Oeste, Paraná) foi adquirida na forma farelada pronta para extrusão. Foram adicionados a essa dieta os níveis crescentes do FOS correspondentes a cada tratamento, homogeneizados e levados à extrusora com capacidade para 40 kg/hora acoplada a secador rotativo. Após extrusão, as rações foram mantidas em estufa de ventilação forçada por 24h (36° C), armazenadas em

sacos plásticos resistentes, devidamente identificados e mantidas sob refrigeração em freezer (-21° C) até seu uso.

Tabela 2. Níveis de garantia e composição básica das dietas experimentais utilizadas para o tratamento de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Níveis de garantia			
Umidade máxima	120g/Kg		
Proteína bruta (min)	320g/Kg		
Extrato etéreo (min)	40g/Kg		
Matéria mineral (máx.)	85g/Kg		
Composição básica			
Nutriente (%)	Ração Controle	Ração 0,2% FOS	Ração 0,4% FOS
Proteína Bruta	32,70	33,86	33,62
Extrato Etéreo	5,10	5,22	5,39
Matéria Seca	90,79	92,71	91,38
Matéria Mineral	10,54	10,73	10,23

Premix vitamínico e mineral (por kg de ração) cálcio (min/máx.): 9/18 g/kg, fosforo (min) 9 g/kg, lisina 15 g/kg, metionina 5100 mg/kg, vitamina A (min) 15.000 UI/kg, vitamina D3 (min): 3000 UI/kg, vitamina E (min): 180 mg/kg, vitamina K3 (min): 6,0 mg/kg, vitamina B1 (min): 18 mg/kg, vitamina B2 (min): 32 mg/kg, vitamina B6 (min): 22 mg/kg, vitamina B12 (min): 40 mcg, vitamina C (min): 422 mg/kg, ácido nicotínico 150 mg/kg, ácido pantotênico 60 mg/kg, ácido fólico (min): 10 mg/kg, biotina (min): 1,50 mg/kg, inositol (min): 238 mg/kg, ferro (min): 65 mg/kg, cobre (min): 10,40 mg/kg, zinco (min): 130 mg/kg, manganês (min): 65 mg/kg, iodo (min): 1,30 mg/kg, selênio (min): 0,40 mg/kg, cobalto (min): 0,35 mg/kg, sódio 2400 mg/kg, colina 350 mg/kg, antioxidante 200 mg/kg, aditivo enzimático 125 mg/kg.

Tanto a mistura para extrusão da ração como as rações extrusadas (controle, 0,2% e 0,4% de FOS) foram analisadas para proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria seca (MS) e matéria mineral (MM), de acordo com os métodos preconizados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999). A proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, a matéria seca determinada em estufa a 105°C, a matéria mineral em forno mufla 550-600 °C e o extrato etéreo em extrator Ankom® (XT15).

Ao final dos sessenta dias de período experimental, os peixes foram submetidos a 24h de jejum, anestesiados (solução alcoólica de benzocaína 1:10.000), pesados e medidos. A partir dos dados coletados, foram calculados os seguintes parâmetros de desempenho (TACON, 1990):

- Ganho de peso médio (g)

$$GPM = PF - PI$$

- Índice de conversão alimentar (g)

$$ICA = \frac{\text{consumo da dieta}}{GPM}$$

- Taxa de crescimento específico (%)

$$TCE = \frac{\ln PF - \ln PI}{\text{dias}} \times 100$$

- Fator de condição (%)

$$K = \frac{\text{peso}}{\text{comprimento}^3}$$

Em que: PF= peso final, PI= peso inicial, ln= logaritmo natural

3.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Ao final do período de experimento, três peixes de cada repetição (12 peixes por tratamento) foram sedados em solução alcoólica de benzocaína (1:10.000) para coleta de sangue por meio de punção do vaso caudal utilizando seringas plásticas descartáveis de 3 mL previamente umedecidas com heparina. Foram avaliados os seguintes indicadores: estimativa da concentração da hemoglobina (Hb), valor do hematócrito (Ht), contagem total dos eritrócitos (CTE), contagem total dos leucócitos (CTL) e trombócitos (CTT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Para a estimativa da concentração da hemoglobina foi utilizado o método da cianometahemoglobina (BLAXHALL & DAISLEY, 1973). O método baseia-se na oxidação do átomo de ferro da molécula de hemoglobina pelo ferricianeto de potássio, formando a metahemoglobina que é convertida em cianometahemoglobina após a reação com o cianeto de potássio.

Para calcular o hematócrito, amostras sanguíneas homogêneas foram introduzidas em capilares para microhematócrito e uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 g em centrífuga de microhematócrito

(GOLDENFARB et al., 1971) e a avaliação feita com auxílio da tabela de microhematócrito e expressa como volume de eritrócitos/100 cm³.

Para contagem total de eritrócitos, alíquotas de sangue foram diluídas em um tubo de ensaio na proporção 0,02 mL de sangue para 4,0 mL de solução formol citrato. Após homogeneização da solução a contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Foram contados os eritrócitos contidos nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara e o resultado expresso em número de eritrócitos/mm³.

A contagem total de leucócitos e trombócitos foi realizada através da confecção de extensões sanguíneas de cada animal em lâminas de vidro com extremidade fosca, secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. A contagem total de leucócitos e trombócitos foi realizada pelo método indireto (MARTINS et al., 2004) utilizando-se a seguinte fórmula:

- **Leucócitos (por μL)** =
$$\frac{n^\circ \text{ leucócitos } \times n^\circ \text{ eritrócitos (por } \mu\text{L})}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

- **Trombócitos (por μL)** =
$$\frac{n^\circ \text{ trombócitos } \times n^\circ \text{ eritrócitos (por } \mu\text{L})}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

A proteína total plasmática foi mensurada a partir de alíquotas de plasma separadas por centrifugação das amostras de sangue coletadas. A partir disto a concentração total de proteína plasmática foi determinada por meio de refratômetro portátil (RHC-200/ATC) em g/dL.

As variáveis hematimétricas foram determinadas de acordo com Wintrobe (1934) pelos cálculos:

- **VCM (fL)** =
$$\frac{\text{hematócrito} \times 10}{n^\circ \text{ total de eritrócitos}}$$

- **HCM (pg)** =
$$\frac{\text{concentração da hemoglobina}}{n^\circ \text{ total de eritrócitos}}$$

- **CHCM (g/dL)** =
$$\frac{\text{concentração da hemoglobina} \times 100}{\text{hematócrito}}$$

3.5 Avaliação dos parâmetros imunológicos

O material biológico utilizado foi coletado como descrito no item 3.3. Foram avaliadas a concentração de lisozima sérica e no muco, bem como a atividade respiratória dos leucócitos (Burst oxidativo).

A concentração de lisozima sérica foi determinada em ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1999) e adaptado por Abreu et al. (2009). Antes de determinar a concentração de lisozima das amostras de soro dos peixes, foi realizada a curva padrão de calibração pela quantificação das diferenças das densidades ópticas iniciais e finais (ΔDO) de diferentes concentrações da lisozima padrão.

A partir da curva determinada, foram quantificadas as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta e as respectivas variações na densidade óptica (ΔDO). Para isso, as amostras de soro foram submetidas ao tratamento térmico (banho a 56°C por 30 minutos) para desnaturação e inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo que a lise do *M. lysodeikticus* fosse provocada exclusivamente por ação da lisozima. Após o banho, em uma cubeta de 1,0 mL foi pipetado 150 μL de soro ao qual se adicionou 150 μL de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH 6,2) e incubada a 26 °C por dois minutos. Após esse período, foram adicionados mais 300 μL da suspensão de *M. lysodeikticus* totalizando um volume final de 600 μL . A ΔDO em 450 nm foi avaliada em leitura cinética após cinco minutos a temperatura ambiente e os resultados expressos em $\mu g/mL$ de soro. Após a coleta de sangue, os peixes foram submetidos ao protocolo proposto por Ross et al. (2000) para a coleta do muco. Eles foram transferidos para embalagens plásticas tipo zip-lock contendo 5 mL de solução com 100 mol de bicarbonato de amônia (NH_4HCO_3), pH 7,8 e massageados durante um minuto. O extrato com muco foi transferido para tubos tipo Falcon, centrifugados (2730 x g) por 15 minutos para a remoção de escamas e outros materiais insolúveis, congelados a -20°C e então liofilizados (LIOTOP® L108) para posterior análise da concentração de lisozima do muco.

Para a determinação da concentração de lisozima no muco, o extrato do muco liofilizado foi ressuspenso em igual volume de tampão fosfato (0,05 M; pH 6,2) e procedeu-se com o mesmo método da análise realizada no soro.

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada de acordo com Anderson e Siwicki (1994), com modificações propostas por Biller-Takahashi et al. (2014). Para dosagem, 0,1 mL do sangue total (com heparina) foi adicionado a 0,1 mL de nitroblue tetrazolium. Após incubação, 50 μL da suspensão homogeneizada foram transferidos para um tubo de vidro com 1,0 mL de N, N-dimetil formamida e centrifugado a 3000 x g por 5

minutos. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular que lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de formazan liberando para a solução o corante NBT reduzido. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para avaliar normalidade. Para as variáveis que não apresentaram normalidade (contagem total de leucócitos e trombócitos), aplicou-se a transformação de dados utilizando Log 10. Posteriormente, os dados foram submetidos a análise de variância e quando ocorreu efeito significativo ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey por meio do Software Estatístico SAS University Edition.

4. RESULTADOS

4.1 Desempenho zootécnico

A análise de variância não detectou efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre o consumo total (CT), ganho de peso médio (GPM), índice de conversão alimentar (ICA), taxa de crescimento específico (TCE) e fator de condição (K) (tabela 3).

Tabela 3- Médias e desvio padrão (\pm DP) de consumo total (CT) por tratamento, ganho de peso médio (GPM) por tratamento, índice de conversão alimentar (ICA) por tratamento, taxa de crescimento específico (TCE) por tratamento e fator de condição (K) por tratamento de pacus (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta

FOS (%)	CT (g)	GPM (g)	ICA (g)	TCE (%)	K (%)
0,0	1273,46 \pm 51,84	527,26 \pm 105,99	2,68 \pm 0,51	1,14 \pm 0,22	0,03 \pm 0,0005
0,2	1222,96 \pm 108,38	713,78 \pm 73,84	1,90 \pm 0,26	1,36 \pm 0,27	0,03 \pm 0,0005
0,4	1305,66 \pm 91,63	620,52 \pm 40,38	2,14 \pm 0,41	1,34 \pm 0,07	0,03 \pm 0,0005
(P) valor	0,43	0,30	0,13	0,21	0,61

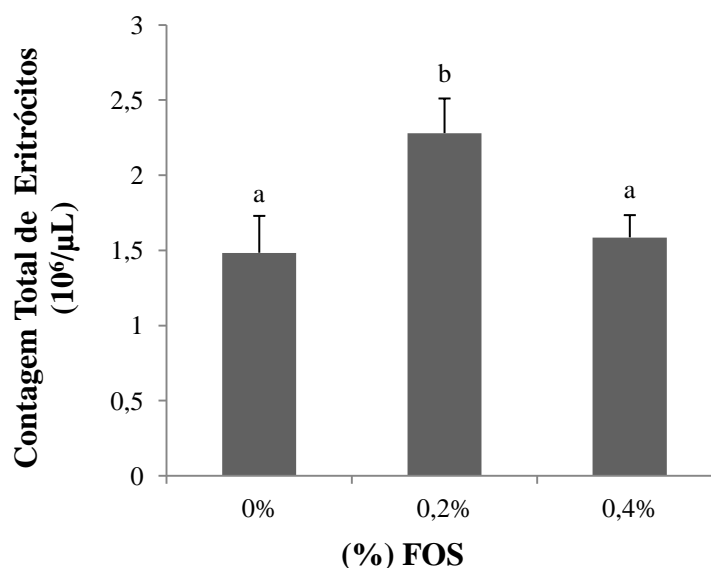
4.2 Parâmetros hematológicos

Os resultados do hematócrito, proteína total sérica e concentração de hemoglobina apresentam-se sumarizados na tabela 4. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) sobre tais parâmetros. Já a contagem total de eritrócitos foi influenciada ($P < 0,05$) pelos tratamentos, como demonstrado na figura 2.

Tabela 4- Médias e desvio padrão (\pm DP) do hematócrito (Ht), proteína total sérica (PTS) e concentração de hemoglobina (Hb) de pacus (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta

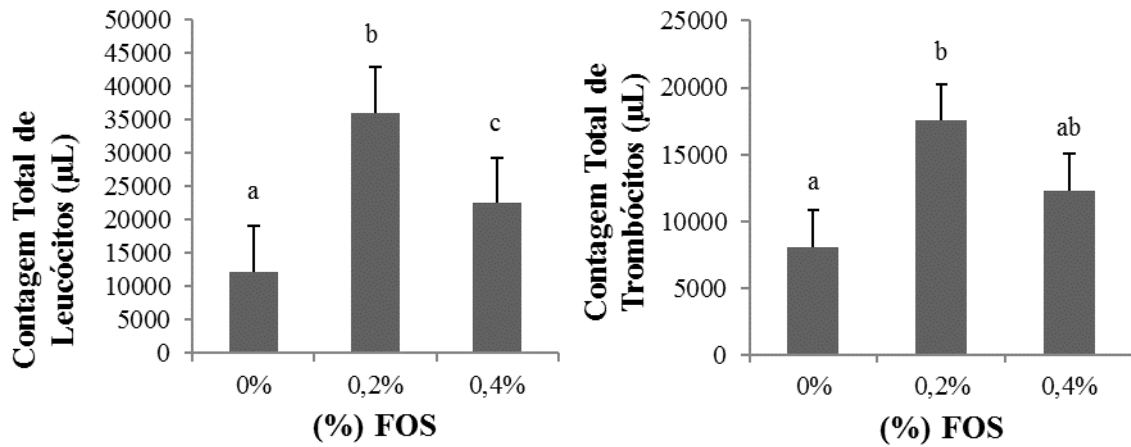
FOS (%)	Ht (%)	PTS (g/dL)	Hb (g/dL)
0,0	33,10 \pm 2,6	5,25 \pm 0,2	5,24 \pm 0,6
0,2	31,91 \pm 3,7	5,23 \pm 0,2	5,58 \pm 0,6
0,4	32,91 \pm 3,0	5,10 \pm 0,2	5,30 \pm 0,5
(P) valor	0,6439	0,3696	0,3992

Figura 2- Contagem total dos eritrócitos em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta. Diferentes letras acima de cada barra denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)



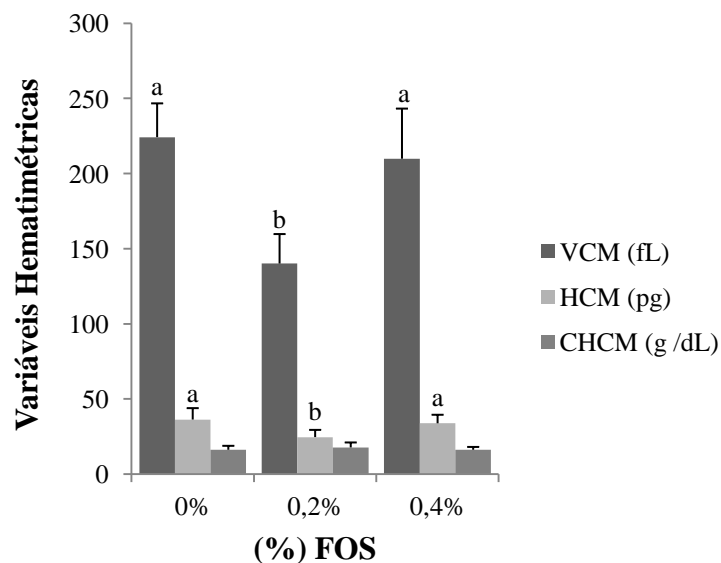
Para a contagem total de leucócitos e trombócitos houve diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Os resultados são demonstrados na figura 3.

Figura 3- Contagem total de leucócitos e trombócitos em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)



As variáveis hematimétricas volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) foram influenciados ($P < 0,05$) pelos tratamentos. Entretanto a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não foi influenciada ($P > 0,05$) pelos tratamentos (figura 4).

Figura 4- Variáveis hematimétricas do pacu (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) na dieta. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).



4.3 Parâmetros imunológicos

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre a concentração de lisozima sérica, lisozima no muco e sobre a atividade respiratória dos leucócitos, o burst oxidativo (tabela 6).

Tabela 5- Médias e desvio padrão (\pm DP) da concentração de lisozima sérica (LS), lisozima no muco (LM) e burst oxidativo de pacus (*P. mesopotamicus*) suplementados com diferentes níveis de inclusão de frutooligosacarídeo (FOS) na dieta

FOS (%)	LS ($\mu\text{g/mL}$)	LM ($\mu\text{g/mL}$)	Burst oxidativo (D.O)
0,0	1,39 \pm 0,33	1,05 \pm 0,48	0,27 \pm 0,03
0,2	1,07 \pm 0,36	0,97 \pm 0,42	0,26 \pm 0,03
0,4	1,16 \pm 0,39	1,12 \pm 0,42	0,28 \pm 0,04
(P) valor	0,14	0,74	0,65

5. DISCUSSÃO

O FOS não teve a capacidade imunomodulatória esperada nas condições testadas. Akrami et al. (2013) ao avaliarem níveis crescentes de FOS na dieta de esturjão-estrelado (*Acipenser stellatus*) por 75 dias, obtiveram influência nos parâmetros de ganho de peso, taxa de crescimento específico e conversão alimentar com 1% de inclusão do prebiótico, resultado este, diferente do presente estudo, que não apresentou diferença estatística entre os tratamentos testados.

Essas alterações admissíveis no crescimento, proveito da dieta e capacidade de uso em benefício da saúde são, muito provavelmente, oriundas de fatores orgânicos, como diferentes variações inter e intraespecíficas, tempo de oferta na alimentação, dose e categoria de imunostimulante (YE et al., 2011). A relação positiva entre a alimentação com prebiótico e um melhor desempenho zootécnico pode resultar da alta ação digestiva de enzimas e melhorias na morfologia intestinal (MASLOWSKI; MACKAY, 2010) e do crescimento de bactérias benéficas – ácido láticas e *Bacillus* spp (ZHANG et al., 2011; SANG et al., 2011) que produzem ácidos, os quais minimizam a concentração de microrganismos patogênicos e mantem a integridade da mucosa intestinal, por consequência (SONG et al., 2014), o que resulta em melhorias nos processos de digestão e absorção dos nutrientes (PELICANO et al. 2002)

Segundo Pope e Kruse (2001), o fator de condição é um indicador das reservas energéticas dos tecidos, necessário para mensurar a condição corporal dos peixes e assim

determinar seu desempenho zootécnico. A suplementação dietética com 0,2 % e 0,4% não alterou o fator de condição dos juvenis de pacu alimentados por sessenta dias. Os resultados corroboram com os de Soleimani et al. (2011), que não obtiveram influência dos tratamentos com inclusão de 1%, 2% e 3% de FOS na alimentação de alevinos de *Rutilus rutilus* por sete semanas. Esse índice pode variar em decorrência das características de cada espécie, diferenças nas condições do ambiente ao qual os peixes foram mantidos, dieta e período reprodutivo (FROESE, 2006). Desta forma, a correlação peso-comprimento não sofreu interferência do prebiótico em relação ao tratamento controle, demonstrada pela relação do tipo isométrica.

A proporção dos glóbulos vermelhos em relação à parte líquida do sangue é obtido através do hematócrito, que pode estar aumentado quando o animal está sob condições de estresse (BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006). O valor do hematócrito e a concentração de hemoglobina não foram influenciados pela adição de níveis crescentes de FOS na dieta. Em estudo realizado com espécimes de *Lates calcarifer*, o hematócrito e a concentração de hemoglobina apresentaram aumento significativo em relação ao tratamento controle e aos demais tratamentos (2,5%, 7,5% e 10%) quando os peixes foram alimentados por 45 dias com dieta contendo 5% de inclusão de FOS (ALI et al., 2016), o que reforça o argumento das variações de respostas entre diferentes espécies, doses e dias de alimentação, bem como sugere que os animais não estavam em condições de estresse e sim mantendo seus níveis dentro do esperado para a espécie.

A proteína sérica total é um forte indicador de respostas inatas em peixes (ANDREWS et al., 2011) e seu aumento indica que o peixe está imunologicamente seguro (NAYAK et al., 2004). Embora a inclusão de FOS não tenha modificado os valores de proteína sérica total, eles permaneceram próximos aos encontrados em outros estudos com pacu (BICUDO et al., 2009; TAVARES-DIAS; MORAES, 2010).

Em relação a contagem total de eritrócitos, o tratamento com 0,2% de inclusão de FOS apresentou o maior número dessas células quando comparado ao tratamento controle e ao 0,4% de FOS, que não diferiram entre si. Já na contagem total de leucócitos, os tratamentos com inclusão de FOS apresentaram maior número das células comparado ao controle, sendo o tratamento com 0,2% de FOS superior ao de 0,4% de inclusão. Já o número total de trombócitos foi maior ($P < 0,05$) quando comparado ao tratamento controle nos peixes suplementados com 0,2% de FOS.

Quanto aos índices hematimétricos, tanto no VCM quanto no HCM o tratamento com 0,2% de FOS foi menor comparado aos demais tratamentos. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos no CHCM.

Relacionando os dados, esperava-se que o hematócrito do tratamento 0,2% também fosse significativamente maior que dos outros, já que a contagem dos eritrócitos foi elevada. Mas, quando analisados os índices hematimétricos, tem-se a diminuição significativa ($P < 0,05$) do volume corpuscular médio (VCM) no tratamento 0,2%, ocasionando uma microcitose, caracterizado pela diminuição em volume dos eritrócitos, além de um menor ($P < 0,05$) HCM em relação aos outros dois tratamentos.

Os peixes do tratamento com 0,2% de FOS apresentaram os eritrócitos de menor tamanho e com menor quantidade de hemoglobina. Em contrapartida, foram os peixes que obtiveram maior número de eritrócitos, em quantidade, o que igualou o valor do hematócrito entre todos os tratamentos.

Resultado semelhante foi encontrado por Delbon (2006), visto que o número de eritrócitos aumentou em consequência de uma diminuição do VCM. O que intensifica a hipótese é a similaridade dos valores de CHCM, constatando que, proporcionalmente, a quantidade de hemoglobina estava coerente em relação ao tamanho da célula, além de que os dados se encontram dentro dos valores descritos por Tavares-Dias et al. (1999), demonstrando que não houve quadro de anemias.

Assim como no número total de eritrócitos, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) de leucócitos e trombócitos dos animais do tratamento com 0,2% de prebiótico. Essas células são consideradas de defesa orgânica, associadas a imunidade inata e específica, com funções de modular o sistema imune, fagocitar e manter a homeostasia (URBINATI et al., 2014; RANZANI-PAIVA et al., 2013). Em peixes, o aumento da atividade imunológica pode ser explicado pelo fato de que o sistema imune inato desses animais reconhece substâncias exógenas por meio de receptores presentes nas células de defesa. Tais receptores podem reconhecer proteínas e moléculas características de microrganismos e de vegetais, como polissacarídeos, lipopolissacarídeos, oligossacarídeos (SONG et al., 2014; BILLER-TAKAHASHI et al., 2014).

Por ser o FOS um prebiótico da classe dos oligossacarídeos, derivado de vegetais, pode ser reconhecido pelo sistema imune dos peixes, acarretando assim um estímulo de defesa e resultando em maior dessas células, o que explica o seu aumento significativo em comparação ao tratamento controle.

É importante salientar que os parâmetros hematológicos dos peixes podem variar em grande medida, sendo estes dependentes de alguns fatores, como a espécie do peixe estudado e da suplementação prebiótica, possibilitando resultados contraditórios e não tão nítidos (SADO et al., 2010; VETVICK et al., 2013).

A lisozima é uma enzima produzida pelos leucócitos, considerada essencial para a defesa do organismo, lisando a membrana de bactérias gram-positivas e gram negativas. Em peixes, ela está distribuída sobre a pele, muco, brânquias, trato intestinal, soro, tecidos linfóides e outros fluidos corporais (PALAKSHA et al., 2008). Alterações nos níveis séricos de lisozima podem ocorrer devido ao sexo, sazonalidade, maturação sexual, alimentação, qualidade da água, infecções e estresse (HERNÁNDEZ E TORT, 2003). Frente aos níveis testados no presente estudo, tanto a lisozima sérica quanto no muco não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Mesmo os peixes alimentados com FOS apresentando maior número total de leucócitos, não houve atividade dessas células na produção de lisozima, resultado constatado pela análise da atividade de lisozima. Os animais foram mantidos em ambiente controlado e com rápidos manuseios, dessa forma, não permaneceram submetidos a fatores estressantes, o que poderia alterar parâmetros imunológicos (TORT, 2011) e nem receberam estímulos externos que pudessem alterar as condições de cultivo, bem como acometimento por bactérias patogênicas. Por ser uma enzima que degrada a parede desses microrganismos, apesar do aumento no número total das células produtoras, sua atividade não foi desencadeada e, portanto, não estimulada pelo uso do FOS.

Ai et al. (2011) ao suplementarem juvenis de *Larimichthys crocea* com *B. subtilis* e FOS (0, 0,2% e 0,4%) por 10 semanas também não observaram influência do FOS na atividade da lisozima, tanto quando administrado individualmente como em interação com o *B. subtilis*. O autor relata que os efeitos da suplementação dietética do FOS precisam de reavaliação sob várias condições de cultivo, uma vez que alterações no ambiente podem refletir no estado de saúde dos animais, além dos níveis de inclusão e espécies.

Resultado diferente foi encontrado por Dong e Wang (2013) ao avaliarem a expressão de alguns genes relacionados ao sistema imunológico, tendo superestimulação do gene associado a lisozima ao adicionar FOS na dieta de *Procambarus clarkii* a partir de 5% (0%, 2%, 5%, 8% e 10%). A expressão do gene da lisozima demonstrou que houve regulação positiva dos peptídeos antimicrobianos, ação que reforçou a capacidade da hemolinfa de eliminar bactérias patogênicas, aumentando assim a resistência dos animais a esses microrganismos, sugerindo que a inclusão de FOS a partir de 5% na dieta desses crustáceos

pode influenciar a imunidade não apenas no nível de proteína, mas também na transcrição gênica. Tal constatação reafirma a possibilidade de alterações em relação aos níveis de prebióticos e espécie.

A fagocitose é um dos mais importantes mecanismos de defesa dos peixes, sendo realizada principalmente por neutrófilos e macrófagos (NEUMANN et al., 2000). Após a sinalização da injúria por meio da liberação de citocinas no local da lesão, os fagócitos são atraídos até o sítio da invasão e iniciam o processo de fagocitose, englobando o microrganismo e destruindo-o (MATHIAS et al., 2009).

Quando há um estímulo que desencadeia o processo de fagocitose pelas células fagocitárias, iniciam-se também diversos eventos microbicidas intracelulares, que matam e digerem os patógenos (ROITT et al., 1998). O início da fagocitose demanda um aumento no consumo do oxigênio molecular, denominado burst oxidativo; havendo a redução da molécula de oxigênio, gerando as chamadas “espécies reativas do oxigênio” (EROS). O oxigênio é reduzido a ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Todas essas EROS são altamente oxidantes aos microrganismos, agindo de forma a destruí-los (VERLHAC et al., 1998).

Por meio da análise da atividade respiratória dos leucócitos é possível detectar se houve ou não produção das espécies reativas de oxigênio, consequência da resposta imune desencadeada pelo organismo, a fagocitose. De forma semelhante ao resultado da atividade da lisozima, houve um aumento no número dos leucócitos de peixes alimentados com o FOS, porém sem exercerem sua função fagocítica, podendo assim considerar que os animais não sofreram injúrias oriundas de bactérias patogênicas. Logo, sem estímulos à fagocitose, também não houve o aumento no consumo de oxigênio através da respiração celular com formação das espécies reativas de oxigênio, constatando que a suplementação com FOS não mostrou efeito sobre o burst oxidativo em nenhum dos níveis testados.

Resultado distinto foi encontrado por Zhang et al. (2014), que obtiveram influência dos tratamentos tanto na interação de *B. subtilis* ($5,62 \times 10^7$ UFC e $1,05 \times 10^7$ UFC) com FOS (0,2% e 0,4%) como também quando adicionado somente FOS por oito semanas na dieta de juvenis de *Trachinotus ovatus*. Segundo Roberfroid (2000) os prebióticos quando ofertados em forma simbiótica (prebiótico e probiótico) podem aumentar a sobrevivência desses probióticos no trato gastrointestinal dos peixes, permitindo a reprodução dessas bactérias de forma rápida, assegurando seus benefícios. Outro estudo realizado por Rodriguez-Estrada et al. (2009) demonstra que o uso do probiótico associado ao prebiótico promove melhor resposta imune quando comparado a sua inclusão individual.

Tal resultado observado no trabalho com juvenis de *Trachinotus ovatus* pode ser explicado devido ao efeito sinérgico que o prebiótico e o probiótico demonstraram quando administrados conjuntamente, visto que a complementariedade da imunidade específica e inespecífica ficou evidente com a melhoria na sobrevivência relativa. Como a imunidade específica demanda longo prazo para produção de anticorpos bem como de memória, essa maior sobrevivência pode ser primeiramente mantida pela atividade da imunidade inespecífica, que aumentou a resistência dos peixes, permitindo posterior desenvolvimento da imunidade específica, o que assegurou a sobrevivência dos animais após contato com microrganismos (ZHANG et al., 2014).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o frutooligossacarídeo adicionado a ração de pacus em níveis crescentes não apresentou atividade imunoestimulatória. É preciso que mais trabalhos sejam desenvolvidos com a espécie e prebiótico em questão, com tempos e doses distintas, bem como em condições que desafiem os animais, para que se possa afirmar com segurança os resultados obtidos, bem como encontrar o melhor método de utilização do prebiótico FOS na alimentação de pacus.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

AI, Q.; XU, H.; MAI, K.; XU, W.; WANG, J.; ZHANG, W. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, v. 317, p. 155-161, 2011.

AKRAMI, R., IRI, Y., ROSTAMI, H.K., RAZEGHI, M.M. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish Shellfish Immunology*, v. 35, p. 1235–1239, 2013.

ALI, S.S.R.; AMBASANKAR, K.; PRAVEENA, P.E.; NANDAKUMAR, S.; SYAMADAYAL, J. Effect of dietary fructooligosaccharide supplementation on growth, body composition, hematological and immunological parameters of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture international*, v. 25, n. 2, p. 837-848, 2017.

ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic hematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M.; Arthur, J.R.; Subasinghe, R.P. (Ed.) **Diseases in Asian Aquaculture II**. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p. 185-202, 1994.

ANUÁRIO PEIXE BR, 2018. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-peixebr2018/>> Acesso em: 19 julho 2018.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of association of official analytical chemists**. 16 ed. Washington D. C. 1141p, 1999.

BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; CYRINO, J.E.P. Growth and hematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. *Aquaculture Research*, v.40, p.486-495, 2009.

BILLER -TAKAHASHI, J.D.; MONTASSIER, H.J.; TAKAHASHI, L.S.; URBINATTI, E.C. Proposed method for agglutinating antibody titer analysis and its use as indicator of acquired immunity in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 74(1), p. 238 - 242, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.; MARCOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with B-glucan. *Brazil Journal of Biology*, v. 74, n. 7, p. 698-703, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; URBINATI, E.C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 3, p. 1484-1506, 2014.

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

BORGES, A.; CONTE-JUNIOR, C.A.; FRANCO, R.M.; FREITA, M.Q. Quality Index Method (QIM) developed for pacu *Piaractus mesopotamicus* and determination of its shelf life. *Food Research International*, v. 54, p. 311–317, 2013.

BOYD, C.E.; QUEIROZ, J.F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M. et al. (Eds.) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 25-43, 2004.

BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish Shellfish Immunology**, v. 19, p. 457-472, 2005.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal: manual de identificação. Brasília: **EMBRAPA**, 2 ed., 227p, 2007.

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8(7), p. 1137-1144, 2006.

DAVIS, K.B., B.R. GRIFFIN & W.L. Gray. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. **Aquaculture**, v. 214, p. 55-66, 2002.

DELBON, M.C. Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*. **Dissertação** (Mestrado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DONG, C.; WANG, J. Immunostimulatory effects of dietary fructooligosaccharide on red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). **Aquaculture Research**, v. 44, p. 1416-1424, 2013.

DÜGENCI, S.K.; ARDAB, N.; CANDANA, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 88(1), p. 99-106, 2003.

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

ELLIS, E. A. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-839, 2001.

FAGUNDES, R.L.M.; COSTA, Y.R. Uso de alimentos funcionais na alimentação. **Higiene alimentar**, v. 17, n. 47, p. 42-48, 2003.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Fisheries and Aquaculture Department, 2018. **The state of world fisheries and aquaculture**, Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>>

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight-Length relationship: history, meta-analysis and recommendations. **Journal Applied of Ichthyology**, v. 22, p. 241- 253, 2006.

GABRIEL, N.N.; QIANG, J.; HE, J.; MA, X. Y.; KPUNDEH, M.D.; XU, P. Dietary Aloe Vera supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 2, p. 504-514, 2015.

GARCIA, F.; ROMERA, D. M.; GOZI, K. S.; ONAKA, E. M.; FONSECA, F. S.; SCHALCH, S. H.; CANDEIRA, P. G.; GUERRA, L. O. M.; CARMO, F. J.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M. I. E. G.; E PORTELLA, M. C. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, v. 410, p. 51-56, 2013.

GATLIN, D.M; LI, P; WANG, X.; BURR, G. S.; CASTILLE, F.; LAWRENCE, A.L. Potential application of prebiotics in aquaculture, **8 th International symposium on aquaculture nutrition**, p. 371-376, 2006.

GODOY, M.P. Peixes do Brasil, Subordem Characoidei: Bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: Ed. Franciscana, v. 2, 847p. 1975.

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

GUERREIRO, I., OLIVA-TELES, A., ENES, P. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. **Aquaculture**, v. 441, p. 57–63, 2015.

GUERREIRO, I., PÉREZ-JIMÉNEZ, A., COSTAS, B., OLIVA-TELES, A. Effect of temperature and short chain fructooligosaccharides supplementation on the hepatic oxidative status and immune response of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 40, p. 570–576, 2014.

HE, S.; XU, G.; WU, Y.; WENG, H.; XIE, H. Effects of IMO and FOS on the growth performance and non-specific immunity in hybrid tilapia. **Chinese Feed**, v. 23, p. 14-15, 2003.

HERNÁNDEZ, A.; TORT, L. Annual variation of complement, lysozyme and haemagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15 p. 479-481, 2003.

HOSEINIFAR, S.H., SHARIFIAN, M., VESAGHI, M.J., KHALILI, M., ESTEBAN, M.Á. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. **Fish Shellfish Immunology**, v. 39 (2), p. 231–236, 2014.

HOSEINIFAR, S.H.; MIRVAGHEFI, A.; MERRIFIELD, D.L.; MOJAZI AMIRI, B.; YELGHI, S.; DARVISH BASTAMI, K. The study of some hematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 91-96, 2011.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 13 set. 2018.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221(1-4), p. 277-287, 2003.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contributions to Microbiology**, v. 15, p. 118-146, 2008.

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

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

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

- LI, G.; GUO, Y.; ZHAO, D.; QIAN, P.; SUN, J.; XIAO, C.; LANG, L.; WANG, H. Effects of levamisole on the immune responses and disease resistance of *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 212-217, 2006.
- LIMA, P. C. W. C.; TORRES, V. M.; RODRIGUES, J. A. G.; SOUSA, J. J.; FARIAS, W. R. L. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40(1), p. 79-85, 2009.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (Overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137-151, 2006.
- MAI, D.I., FATHI, M., MESALHY, S., EL-ATY, A.M.A. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 29, p. 241-246, 2010.
- MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T. Hematological alterations of *Leporinus microcephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporine* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 640-645, 2004.
- MASLOWSKI, K.M.; MACKAY, C.R. Diet, gut microbiota and immune responses. **Nature Immunology**, v. 12, p. 5-9, 2010.
- MATHIAS, J. R.; DODD, M. E.; WALTERS, K. B.; YOO, S. K.; RANHEIM, E. A.; HUTTENLOCHER, A. Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 11, p. 1212-1217, 2009.
- MIANDARE, H.K., FARVARDIN, S., SHABANI, A., HOSEINIFAR, S.H., RAMEZANPOUR, S.S. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 55, p. 479-483, 2016.
- MIANDARE, H.K., FARVARDIN, S., SHABANI, A., HOSEINIFAR, S.H., RAMEZANPOUR, S.S.; MISSOTTEN, J.A.M.; MICHIELS, J.; GORIS, J.; HERMAN, L.; HEYNDRIKX, M.; DE SMET, S.; DIERICK, N.A. Screening of two probiotic products for use in fermented liquid feed. **Livestock Science**, v. 108, n.1-3, p. 232-235, 2007.
- MISSOTTEN, J.A.M.; MICHIELS, J.; GORIS, J.; HERMAN, L.; HEYNDRIKX, M.; DE SMET, S.; DIERICK, N.A. Screening of two probiotic products for use in fermented liquid feed. **Livestock Science**, v. 108, n.1-3, p. 232-235, 2007.
- NEUMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A. J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 807-825, 2000.
- NEWMAN, K. Mannanligosaccharides: Natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY OF ANNUAL SYMPOSIUM, 10., 1994, London. **Proceedings...** London: Nottingham University Press, 1994, p. 155-156.
- NYA, E.J.; AUSTIN, B. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 3, p. 845-850, 2011.

NUNES, C. D. S.; MORAES, G.; FABRIZZI, F.; HACKBARTH, A.; ARBELÁEZ-ROJAS, G. A. Growth and hematology of pacu subjected to sustained swimming and fed different protein levels. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** V. 48, p. 645-650, 2013.

PALAKSHA, K. J.; SHIN, G.; KIM, Y.; JUNG, T. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, p. 479-488, 2008.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

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

PICCOLO, G.; CENTODUCATI, G.; ARONO, S.; BOVERA, F.; TUDISCO, R.; NIZZA, A. Effects of the partial substitution of fish meal by soy bean meal with or without mannanoligosaccharide and fructooligosaccharide on the growth and feed utilization of sharpsnout seabream, *diplodus puntazzo* (Cetti, 1777): preliminary results. **Italian Journal of Animal Science**, v. 10, p. 195-199, 2011.

POPE, K.L.; KRUSE, C.G. Assessment of fish condition data. Pp. 51-56, In: C. Guy & M. Brown (eds.). Statistical analyses of freshwater fisheries data. **American Fisheries Society Publication**, North Bethesda, MD. 74p, 2001.

PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. Seminário Novas Alternativas de Mercado, Campinas: ITAL, p. 133-145, 2002.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B. DE.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. Métodos para análise hematológica em peixes. 1ª Ed., Maringá: Edum, 2013.

RAUTA, P.R.; NAYAK, B.; DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. **Immunology Letters**, v. 148, p. 23-33, 2012.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MACGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. Distribution of oxytetracycline plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: implications of Tn 1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, 2000.

RINGØ, E., OLSEN, R.E., GIFSTAD, T.Ø., DALMO, R.A., AMLUND, H., HEMRE, G.I., BAKKE, A.M. Prebiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, p. 117-136, 2010.

RINGO, E.; OLSEN, R. E.; VECINO, J. L. G.; WADSWORTH, S.; SONG, S. K. Use of immunostimulants and nucleotids in aquaculture: a review. **Journal Marine Science Research Development**, v. 2, n. 1, p. 1-22, 2012.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. Mosby 5ª ed. London, UK, 1998.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional food? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1682-1687, 2000.

RODRIGUEZ-ESTRADA, U.; SATOH, S.; HAGA, Y.; FUSHIMI, H.; SWEETMAN, J. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharide and polyhydroxybutyrate acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Suisanzoshoku**, v. 57, p. 609-617, 2009.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só 37 Pacu hematology fed dietary MOS 9 corante de emprego rápido. **Memórias Instituto Butantã**, v. 20. p. 329-334, 1947.

ROSS, N. W., FIRTH, K. J., WANG, A., BURKA, J. F., JOHNSON, S. C. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. **Diseases of Aquatic Organism**, v. 41, p. 43-51, 2000.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E. P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41(S1), p. 66-75, 2010.

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

SAMPAIO-OLIVEIRA, A.M.B.M.; CONTE L.; CYRINO, J.E.P. Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSI, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt. cap. 8, p. 217-238, 2004.

SAMUELSEN, O. B.; BERGH, Ø. Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v. 235, n. 1/4, p. 27-35, 2004.

SANG, H.M.; FOTEDAR, R.; FILER, K. Effects of dietary mannanoligosaccharide on the survival, growth, immunity and digestive enzyme activity of freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (1936). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p 629-35, 2011.

SANTOS, L. C.; CANÇADO, I. A. C. Probióticos e prebióticos: vale a pena incluí-los em nossa alimentação! **SynThesis Revista Digital FAPAM**, Pará de Minas, n.1, 2009. Disponível em: <<http://fapam.web797.kinghost.net/periodicos/index.php/synthesis/article/viewFile/23/20>> . Acesso em: 17 agost. 2018.

SCHMIDT, A. S.; MORTEN, S. B.; DALSGAARD, K. P. Occurrence of antimicrobial resistance in fish pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4908-4915, 2000.

SECOMBES, C. Will advances in fish immunology change vaccination strategies? **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 409-416, 2008.

SECOMBES, C.J., WANG, T.; The innate and adaptive immune system of fish. **Woodhead Publishing Series in Food Science**, p. 3-68, 2012.

SILVA, A. S. S.; HAAS, P.; SARTORI, N. T.; ANTON, A. A.; FRANCISCO, A. Frutooligosacarídeos: Fibras Alimentares Ativas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 295-304, 2007.

SOLEIMANI, N.; HOSEINIFAR, S.H.; MERRIFIELD, D.L.; BARATI, M.; HASSAN ABADI, Z. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. **Fish & Shellfish Immunology**. 32, p. 316-321, 2012.

SONG, S.K.; BECK, B.R.; KIM, D.; PARK, J.; KIM, J.; KIM, H.D.; RINGØ, E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. **Fish Shellfish Immunology**, v. 10, p. 40-48, 2014.

SWANSON, K. S.; GRIESHO, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BAUER, L.L.; CHOW, J.; WOLF, B.W.; GARLEB, K.A.; FAHEY, G.C Jr. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3721-3731, 2002.

TACON, A. G. J.; RAUSIN, N.; KADARI, M.; CORNELIS, P. The food and feeding of marine finfish in floating net cages at the National Seafarming Development Centre, Lampung, Indonesia: rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). **Aquaculture Fisheries Management**, v. 21, p. 375-390, 1990.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus* X *C. macropomum*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 363-368, 2010.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleosteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16 (2), p. 423-431, 1999.

TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. Improved health and growth of fish fed mannanoligosaccharides: Potential mode of action. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, p. 525-544, 2014.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 1366-1375, 2011.

URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt. cap. 6, p. 171-193, 2004.

URBINATI, E.C.; GONCALVES, F.D.; TAKAHASHI, L.S. Pacu: *Piaractus mesopotamicus*. In: Baldisseroto, B, Gomes, LC. (Org.). 2010. **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. 2 edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, capítulo 8, p. 1-606, 2010.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D. Estresse e sistema imune em peixes. In: Bernardo Baldisserotto, José Eurico Possebon Cyrino, Elisabeth Criscuolo Urbinati. (Org.). **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. 1ed. Jaboticabal: Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão (Funep), v.1, p.87-105, 2014.

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

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

VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The effects of β -glucan on fish immunity. **North American Journal of Medicine & Science**, v. 5, p. 580-588, 2013.

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

WU, Y.; LIU, W.B.; LI, H.Y.; XU, W.N.; HE, J.X.; LI, X.F. AND JIANG, G.Z. Effects of dietary supplementation of fructooligosaccharide on growth performance, body composition,

intestinal enzymes activities and histology of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 886-894, 2013.

YE, J.D.; WANG, K.; LI, F.D.; SUN, Y.Z. Single or combined effects of fructo- and mannanoligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. 902-911, 2011.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides: occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 107-117, 1996.

ZHANG, C.N., LI, X.F., JIANG, G.Z., ZHANG, D.D., TIAN, H.Y., LI, J.Y., LIU, W.B. Effects of dietary fructooligosaccharide levels and feeding modes on growth, immune responses, antioxidant capability and disease resistance of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 41, p. 560-569, 2014.

ZHANG, C.N.; LI, X.F.; XU, W.N.; JIANG, G.Z.; LU, K.L.; WANG, L.N.; LIU, W.B. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 35, p. 1380-1386, 2013.

ZHANG, Q.; TAN, B.; MAI, K.; ZHANG, W.; MA, H.; AI, Q.; WANG, X.; LIUFU, Z. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). **Aquaculture Research**, v. 42, p. 943-952, 2011.

ZHANG, Q.; YU, H.; TONG, T.; TONG, W.; DONG, L.; XU, M.; WANG, Z. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide enhance the growth, non-specific immunity of juvenile ovate pompano, *Trachinotus ovatus* and its disease resistance against *Vibrio vulnificus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 38, p. 7-14, 2014.

ZHANG, S; WANG, Z; WANG, H. Maternal immunity in fish. **Developmental and comparative immunology**, v. 39, n. 1-2, p. 72-78, 2013.

ZHOU, Q.C.; ALEJANDRO BUENTELLO, J.; GATLIN III, D.M. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, v. 309, p. 253-257, 2010.