

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/07/2024

At the author's request, the full text of this thesis/dissertation will not be available online until July 29, 2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE E MIO-INOSITOL: EFEITOS NO DESEMPENHO
PRODUTIVO E SAÚDE DE TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DESAFIO POR
INFECÇÃO BACTERIANA

EDGAR JUNIO DAMASCENO RODRIGUES

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor
em Zootecnia

Botucatu – SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE E MIO-INOSITOL: EFEITOS NO DESEMPENHO
PRODUTIVO E SAÚDE DE TILÁPIA DO NILO SUBMETIDA A DESAFIO POR
INFECÇÃO BACTERIANA

EDGAR JUNIO DAMASENO RODRIGUES

Orientador: Prof^a. Ass. Dra. Margarida Maria Barros

Co-orientador: Dr. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor
em Zootecnia

Botucatu – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rodrigues, Edgar Junio Damasceno.

Suplementação de fitase e mio-inositol : efeitos no desempenho produtivo e saúde de tilápia-do-nilo submetida a desafio por infecção bacteriana / Edgar Junio Damasceno Rodrigues. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Margarida Maria Barros

Coorientador: Pedro Luiz Pucci Figueiredo Carvalho

Capes: 50400002

1. Aditivos alimentares. 2. Antioxidantes. 3. Adjuvantes imunológicos. 4. Alimentos funcionais. 5. Tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: Aditivo alimentar; Capacidade antioxidante; Imunoestimulante; Nutrição funcional; *Oreochromis niloticus*.

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **EDGAR JÚNIO DAMASCENO RODRIGUES**, RA nº: ZNP200026, RG nº MG-17.165.381, expedido pela PC/MG, defendeu, no dia 29/07/2024, a tese intitulada **SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE E MIO-INOSITOL: EFEITOS NO DESEMPENHO PRODUTIVO E SAÚDE DE TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DESAFIO POR INFECÇÃO BACTERIANA**, junto ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Curso de Doutorado, tendo sido 'APROVADO'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Botucatu, 29 de julho de 2024



Cláudia Cristina Moreci
Assistente Administrativo
Seção de Pós-Graduação / FMVZ

BIOGRAFIA DO AUTOR

Edgar Junio Damasceno Rodrigues, formiguense e mineiro, nascido em 15 de setembro de 1991, filho de Lúcia Maria de Brito e Edgar Rodrigues de Sousa Faria, de criação simples. Iniciou seu bacharelado em Zootecnia na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em julho de 2010. Sua carreira acadêmica começou como estudante de iniciação científica no setor de aquacultura da UFLA dando seguimento nesta área de pesquisa até a conclusão de seu bacharelado. No ano de 2013, participou do programa de graduação sanduíche “Ciência Sem Fronteiras”, na The University of Queensland em Brisbane QLD, Austrália. Regressou ao Brasil em 2015 para finalizar sua graduação, e no ano de 2018 inicia seu mestrado em nutrição e produção animal na Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, finalizado em 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Lucia e Edgar pelo dom da vida, incentivo e amor.

Ao meu irmão Euler Rodrigues, por todo apoio, amor fraternal e companheirismo.

Às minhas filhas, Helena e Sofia, por me inspirarem a ser um homem melhor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao criador, Olorum, pelo dom da vida, por conceder saúde e força para seguir nessa jornada

Aos meus pais, em especial à minha mãe, pela firmeza, dedicação, amor e anos de luta e trabalho árduo para minha criação e estudos.

Ao meu irmão Euler Rodrigues, que mesmo à distância apoia, motiva e que sempre se fez presente para o que for preciso. Seremos sempre nós dois contra o mundo.

Ao meu padrinho Mozar José de Brito, que me incentivou desde o ensino médio a ingressar em uma universidade, me deu todo o suporte necessário para a conclusão de minha graduação, sempre disposto a auxiliar e compartilhar os mais diversos ensinamentos e que me apresentou ao mundo acadêmico.

Aos meus familiares, que mesmo distantes se fizeram presentes através de ligações, cartas, mensagens. Em especial a minha avó Maria de Lourdes que nunca duvidou do meu potencial e sempre me confortou com seu amor. Ao meu avô, Altalino de Brito, o Sr. Talico (*in memoriam*), quem infelizmente não me viu concluir essa etapa, porém sempre incentivou, acreditou e ensinou aos seus netos: “Seu conhecimento, meu filho, ninguém tira”.

Ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato que me concedeu o privilégio de ser o último orientado da maior referência em digestibilidade de alimentos para peixes do Brasil. Que me acolheu em sua equipe e pacientemente compartilhou tanto conhecimento e experiências de vida, além de fundamentalmente contribuir para a minha formação, acreditar em meu potencial e ser um exemplo em quem se espelhar.

À minha orientadora de doutorado Prof. Dra. Margarida Maria Barros, pelos ensinamentos compartilhados, acolhimento e exemplo de dedicação e profissionalismo. Obrigado por acreditar e apostar em meu potencial.

À toda equipe do laboratório AQUANUTRI, Igor Simões Tiágua Vicente, Matheus Gardim Guimarães, William dos Santos Xavier, Gabriel, Laís, Jaime e demais estagiários pelo acolhimento, companheirismo, confiança, dedicação aos trabalhos e desafios que encaramos juntos e pela amizade construída ao longo dos anos.

À minha orientadora de iniciação científica, Priscila Vieira Rosa e equipe de pesquisa, que durante a minha graduação, lapidaram e moldaram meu perfil acadêmico, acreditaram no meu potencial, forneceram apoio e compartilharam conhecimentos importantes para minha vida profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Gatlin que me recebeu em seu laboratório na Texas A&M, acreditando em meu potencial e compartilhando conhecimentos acadêmicos e pessoal valiosos.

Ao meu coorientador, Dr. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho que sempre me motivou, acreditou em meu potencial, pela amizade e companheirismo. Seu apoio foi fundamental para a conclusão desta etapa.

O apoio, ensinamentos e amizade de todos, amigos e professores, durante meu doutorado e os levarei para a vida toda. Todos vocês foram de suma importância para a conclusão desta etapa de minha carreira, a todos minha gratidão.

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

Try to be the person that your dog thinks you are.

Unkown

RESUMO GERAL

Este estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação *in vitro* de mio-inositol (MI) no *burst respiratório* e proliferação de leucócitos isolados de tilápia do Nilo. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da suplementação dietética de MI e fitase no perfil hematológico, desempenho produtivo, parâmetros dos sistemas imune e antioxidante de tilápias-do-Nilo submetidas à desafio imunológico por infecção bacteriana. A pesquisa foi dividida em três fases distintas: ensaio *in vitro*, desempenho produtivo e desafio imunológico. Para a primeira fase, foram utilizados 60 juvenis com aproximadamente 60 gramas mantidos por 30 dias em 30 aquários (38L). Para a segunda fase, foram utilizados 675 juvenis com aproximadamente 14.9 gramas mantidos por 90 dias em 45 aquários (250L). Após este período foram avaliados: parâmetros zootécnicos, perfil hematológico, atividade de enzimas do sistema antioxidante e respostas imunológicas. Para a segunda fase, 192 peixes provenientes da primeira fase experimental, foram infectados por *Aeromonas hydrophila* e submetidos a desafio imunológico por sete dias. Posteriormente, todos os parâmetros mencionados foram reavaliados, exceto parâmetros zootécnicos. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com um tratamento controle (sem suplementação), quatro níveis de quatro níveis de MI (300, 600, 900, e 1200 mg kg⁻¹ / L⁻¹) para os experimentos *in vitro* e *in vivo* e quatro níveis de fitase (500, 1500, 2500, e 3500 FTU kg⁻¹). Os resultados do estudo *in vitro* demonstraram que a adição de 900 mg L⁻¹ determinou aumento significativo para o *burst respiratório*, atividade fagocítica e proliferação de leucócitos (P<0.05) em relação à cultura celular não suplementada. Resultados semelhantes foram observados no estudo *in vivo* com MI. Baseado nos parâmetros de saúde e desempenho, 900 mg kg⁻¹ foi determinado como nível ótimo de suplementação para tilápias. Considerando os efeitos no desempenho produtivo, e parâmetros de saúde avaliados, 500 FTU kg⁻¹ foi determinado como nível ótimo de suplementação de fitase para tilápia do Nilo. Portanto, a sequência de estudos conduzidos evidencia os efeitos positivos da suplementação de MI e fitase para a espécie estudada sendo recomendada a suplementação de 900 mg kg⁻¹ de MI ou 500 FTU kg⁻¹ em dietas vegetais para melhorar o desempenho e aumentar a resistência da tilápia do Nilo à infecção bacteriana.

Palavras-chave: imunoestimulante; capacidade antioxidante; nutrição funcional;

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of myo-inositol (MI) in vitro supplementation on respiratory burst and proliferation of leukocytes isolated from Nile tilapia. Additionally, the effects of dietary supplementation of MI and phytase on hematological profile, productive performance, immune and antioxidant system parameters of Nile tilapia subjected to a bacterial infection challenge were assessed. The study was divided into three distinct phases: in vitro assay, productive performance, and bacterial challenge. In the first phase, 60 juveniles weighing approximately 60 grams were maintained for 30 days in 30 tanks (38L). For the second phase, 675 juveniles weighing approximately 14.9 grams were kept for 90 days in 45 tanks (250L). After this period, the following parameters were assessed: zootechnical parameters, hematological profile, antioxidant enzyme activity, and immune responses. In the third phase, 192 fish from the first experimental phase were infected with *Aeromonas hydrophila* and subjected to an immunological challenge for seven days. Subsequently, all mentioned parameters were re-evaluated, except for zootechnical parameters. The experiments were conducted using a completely randomized design, with one control treatment (no supplementation), four levels of MI (300, 600, 900, and 1200 mg kg⁻¹ / L⁻¹) for both in vitro and in vivo experiments, and four levels of phytase (500, 1500, 2500, and 3500 FTU kg⁻¹). The in vitro study results demonstrated that the addition of 900 mg L⁻¹ significantly increased respiratory burst, phagocytic activity, and leukocyte proliferation ($P < 0.05$) compared to the non-supplemented cell culture. Similar results were observed in the in vivo study with MI. Based on health and performance parameters, 900 mg kg⁻¹ was determined as the optimal supplementation level for tilapia. Considering the effects on productive performance and health parameters assessed, 500 FTU kg⁻¹ was determined as the optimal phytase supplementation level for Nile tilapia. Therefore, the sequence of studies conducted highlights the positive effects of MI and phytase supplementation for the studied species, recommending the supplementation of 900 mg kg⁻¹ of MI or 500 FTU kg⁻¹ in plant-based diets to improve growth performance and increase Nile tilapia resistance to bacterial infection.

Keywords: immunostimulant; antioxidant status; functional feed;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção global de <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>Oreochromis spp.</i>.....	6
Figura 2. Aplicação de enzimas como aditivo em dietas para aquacultura. Fonte: Adaptado de Liang et al. (2022)	9
Figura 3. Fitato em vegetais.....	14
Figura 4. Hidrólise do ácido fítico (IP6) por fitases ácidas (i e ii), e básica (iii).....	15
Figura 5. Disponibilização de nutrientes pela ação da fitase.....	17
Figura 6. Estrutura química dos nove estéreos isômeros de inositol.....	18
Figura 7. Absorção e biossíntese do mio-inositol em animais.	20
Figure 1 Extracellular superoxide anion production by Nile tilapia head-kidney derived leukocytes incubated with graded levels of myo-inositol (mg L⁻¹)	56
Figure 2. Intracellular superoxide anion production by Nile tilapia head-kidney derived leukocytes incubated with graded levels of myo-inositol (mg L⁻¹)	57
Figure 3. Proliferation of head-kidney-derived leukocytes of Nile tilapia incubated with graded levels of myo-inositol (mg L⁻¹)	57
Figure 4. Phagocytes activity of Nile tilapia head-kidney-derived leukocytes incubated with graded levels of myo-inositol (mg L⁻¹)	58

LISTA DE TABELA

Table 1. Respiratory burst activity of head-kidney-derived leukocytes incubated with graded levelsof myo-inositol (mg L ⁻¹)	55
Table 2. Proliferation capacity upon non-specific stimulation of head-kidney-derived leukocytes incubated with graded levels of myo-inositol (mg L ⁻¹).....	56
Table 1. Chemical Ingredient composition of the experimental diets.	75
Table 2. Growth performance of Nile tilapia fed graded levels of dietary myo-inositol for 90 days ⁻¹	76
Table 4. Biochemical blood parameters of Nile tilapia fed graded levels of dietary myo-inositol and subjected to bacterial challenge.....	78
Table 5. Immunological blood parameters of Nile tilapia fed graded levels of dietary myo-inositol and subjected to bacterial challenge.	79
Table 6. Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde concentration of Nile tilapia fed graded levels of dietary myo-inositol for 90 days.	79
Table 1. Chemical Ingredient composition of the experimental diets.	97
Table 2. Growth performance of Nile tilapia fed graded levels of phytase for 90 days ⁻¹	98
Table 3. Hematological parameters of Nile tilapia fed graded levels of phytase and subjected to bacterial challenge.	99
Table 4. Biochemical blood parameters of Nile tilapia fed graded levels of phytase and subjected to bacterial challenge.	100
Table 5. Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde concentration of Nile tilapia fed graded levels of dietary myo-inositol for 90 days.....	101
Table 6. Immunological blood parameters of Nile tilapia fed graded levels of dietary myo-inositol and subjected to bacterial challenge.	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AquaNutri	Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes
CAT	CATALASE
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EO	Estresse oxidativo
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FTU	Unidades de fitase
<u>GPx</u>	Glutathione Peroxidase
MI	Myo-inositol
NRC	National Research Council
RL	Radicais Livres
SOD	Super Oxido Dismutase
NE	No enzyme inclusion
P	Phosphorus
PAE	Polymer associated to enzyme
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
1.1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	3
1.2. USO DE ENZIMAS NA NUTRIÇÃO DE TILÁPIA DO NILO	5
1.3. FITASE.....	13
1.4. MIO-INOSITOL, BIOSÍNTESE E EXIGÊNCIA NUTRICIONAL	17
1.5. SISTEMA IMUNE DE PEIXES E MIO-INOSITOL.....	21
1.6. SISTEMA ANTIOXIDANTE E MIO-INOSITOL	23
1.7. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> : PARALELO COM ESTUDOS <i>IN VIVO</i> APLICADOS À IMUNOLOGIA DE PEIXES.....	25
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO II.....	43
1. INTRODUCTION.....	45
2. MATERIAL AND METHODS	46
2.1. Fish and culture media	46
2.2. Leukocytes culture.....	47
2.3. Respiratory burst.....	47
2.4. Phagocytes activity	48
2.5. Leukocytes proliferation	49
3. Statistical analysis	49
4. Results.....	49
4.1. Respiratory burst.....	50
4.2. Leukocytes proliferation capacity	51
4.3. Phagocytosis activity.....	51
5. Discussion.....	51
Ethics statement.....	53
Acknowledgements	53
CAPÍTULO III	60
ABSTRACT.....	61
1. Introduction	62
2. Material and Methods	63
2.1. Ethics Statement	63
2.2. Feed processing and growth performance.....	63
2.3. Chemical Bromatological Analyzes.....	65
2.4. Bacterial challenge with <i>Aeromonas hydrophila</i>	65
2.5. Hematological profile	65
2.6. Immunological parameters	66
2.7. Liver antioxidant capacity	66
2.8. Liver lipid peroxidation (MDA)	67
2.9. Statistical analysis.....	67
3. Results.....	67

3.1.	Growth performance	68
3.2.	Hematological and biochemical blood parameters	68
3.3.	Immunological parameters	68
3.4.	Antioxidant capacity and malondialdehyde concentration in liver	68
5.	Conclusion.....	72
	Acknowledgements	72
	References	72
CAPÍTULO IV.....		82
	ABSTRACT.....	83
	Introduction.....	84
1.	Material and Methods	85
2.1	Feed processing and growth performance.....	85
2.2	Chemical Bromatological Analyzes.....	86
2.3	Bacterial challenge with <i>Aeromonas hydrophila</i>	86
2.4	Hematological profile	87
2.5	Immunological parameters	87
2.6	Liver antioxidant capacity	88
2.7	Liver lipid peroxidation (MDA)	88
2.8	Statistical analysis	89
3	Results.....	89
3.1	Growth performance	89
3.2	Hematological and biochemical blood parameters	89
3.3	Immunological parameters	90
4.	Discussion	90
	Ethics Statement	93
	Acknowledgements	93
CAPÍTULO V		105
	IMPLICAÇÕES.....	106

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Capítulo I introduz brevemente parte dos desafios que intensificação da piscicultura promoveu como aumento em densidades de estocagem, utilização de manejos estressantes para animais como biometrias frequentes, classificações e vacinação. Tais fatores tornam o ambiente produtivo desafiador, favorecendo surtos de doenças de origem viral e bacteriana que resultam em altas taxas de mortalidade e redução de produtividade. Por isso, estratégias nutricionais como o uso de aditivos que aumentam a performance e resistência dos peixes, tais como a enzima fitase e *myo-inositol* tem sido cada vez mais estudadas e empregadas visando mitigar os efeitos deletérios de sistemas intensivos de produção.

O Capítulo II trata sobre um ensaio imunológico *in vitro* que avaliou os efeitos da suplementação de mio-inositol em meios de cultura de leucócitos isolados do rim cranial da tilápia do Nilo intitulado: “Myo-inositol increases respiratory burst, cellular proliferation, and phagocytosis of cultured leukocytes from Nile tilapia”. O short communication está redigido de acordo com as normas do periódico Fish and Shellfish immunology (IF 4.7).

O Capítulo III trata sobre um estudo *in vivo* que avaliou os efeitos da suplementação de mio-inositol no desempenho, respostas antioxidantes, imunológicas e sobrevivência da tilápia do Nilo desafiada por infecção bacteriana. O artigo parcial intitulado “Myo-inositol supplementation: effects on growth performance, immunological status, antioxidant system and its gene-related expression of Nile tilapia subjected to a bacterial challenge” está redigido de acordo com as normas do periódico Aquaculture (IF 4.2).

O Capítulo IV trata sobre um estudo *in vivo* que avaliou os efeitos da suplementação de fitase no desempenho, respostas antioxidantes, imunológicas e sobrevivência da tilápia do Nilo desafiada por infecção bacteriana. O artigo parcial intitulado “Dietary phytase improves growth performance, immunological status, antioxidant system and bacterial resistance of Nile tilapia subjected to a bacterial challenge.” está redigido de acordo com as normas do periódico Aquaculture (IF 4.2).

In this study the authors investigated the effects of phytase in growth performance, hematological parameters, antioxidant capacity and immunological responses of Nile tilapia fed graded levels of phytase. Considering the mentioned parameters, 500 FTU kg⁻¹ can be recommended as the optimum dietary level of phytase to increase performance and fish resistance.

Ethics Statement

All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Veterinary and Animal Science College, São Paulo State University (protocol CEUA 0134/2020).

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- Abo Norag, M.A., El-Shenawy, A.M., Fadl, S.E., Abdo, W.S., Gad, D.M., Rashed, M.A., Prince, A.M., 2018. Effect of phytase enzyme on growth performance, serum biochemical alteration, immune response and gene expression in Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol* 80, 97–108. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.05.051>
- Adeshina, I., Akpoilih, B.U., Tihamiyu, L.O., Badmos, A.A., Emikpe, B.O., Abdel-Tawwab, M., 2023a. Effects of dietary supplementation with microbial phytase on the growth, bone minerals, antioxidant status, innate immunity and disease resistance of African catfish fed on high soybean meal-based diets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 107, 733–745. <https://doi.org/10.1111/JPN.13765>
- Adeshina, I., Akpoilih, B.U., Udom, B.F., Adeniyi, O. V., Abdel-Tawwab, M., 2023b. Interactive effects of dietary phosphorus and microbial phytase on growth performance, intestinal morphometry, and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on low-fishmeal diets. *Aquaculture* 563, 738995. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738995>

- Ayhan D, Zeliha S. 2009. Biochemical changes and sensory assessment on tissues of carp *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758 during sale conditions. *Fish Physiol Biochem*. 35(6):709–714
- Chen, K., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., Feng, L., 2017. Effect of dietary phosphorus deficiency on the growth, immune function and structural integrity of head kidney, spleen and skin in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol* 63, 103–126. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2017.02.007>
- Furuya, W.M., Gonçalves, G.S., Furuya, V.R.B., Hayashi, C., 2001. Phytase as feeding for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Performance and digestibility. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30, 924–929. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000400003>
- İbrahim Ö, Zeliha S, Aysel AU. 2011. Modulating effect of selenium on gills of fish exposed to heavy metals. *Fresenius Environ Bull*. 20(1):104–108
- Jiang, W.D., Hu, K., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Zhao, J., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., Feng, L., 2016. Dietary myo-inositol modulates immunity through antioxidant activity and the Nrf2 and E2F4/cyclin signalling factors in the head kidney and spleen following infection of juvenile fish with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 49, 374–386. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.12.017>
- Kakoolaki S, Zeliha S, Oğuz C, Osman C, İlknur Ö. 2013. Role of propolis on oxidative stress in fish brain. *Basic Clin Neurosci*. 4(2):45–50
- Kim, M.S., Min, E.Y., Kim, J.H., Koo, J.K., Kang, J.C., 2015. Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc culture system using probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 47, 141–146. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.08.027>
- Kumar, S., Anand, R., 2021. Effect of Germination and Temperature on Phytic Acid Content of Cereals. *International Journal of Research in Agricultural Sciences* 8.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 96, 335–364. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0396.2011.01169.X>

Li, X.Q., Zhang, X.Q., Kabir Chowdhury, M.A., Zhang, Y., Leng, X.J., 2019. Dietary phytase and protease improved growth and nutrient utilization in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) fed low phosphorus and fishmeal-free diets. *Aquac Nutr* 25, 46–55. <https://doi.org/10.1111/ANU.12828>

Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Lee, C.N., Schrama, J.W., 2021. Effects and interactions between phytase, xylanase and β -glucanase on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia. *Anim Feed Sci Technol* 271, 114767. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2020.114767>

Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Stevens, T.L., Schrama, J.W., 2020. Effect of exogenous enzymes (phytase and xylanase) supplementation on nutrient digestibility and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different quality diets. *Aquaculture* 529, 735723. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735723>

Negm, A.E., Abo-Raya, M.H., Gabr, A.M., Baloza, S.H., El-Nokrashy, A., Prince, A., Arana, D., Wang, Y., Abdelazeem, S., Albadrani, G.M., Al-Ghadi, M.Q., Abdeen, A., Shukry, M., Khalafallah, M.M.E.-S., 2024. Effects of phytase enzyme supplementation on growth performance, intestinal morphology and metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 108, 891–908. <https://doi.org/10.1111/JPN.13939>

Pan, J.H., Feng, L., Jiang, W.D., Wu, P., Kuang, S.Y., Tang, L., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., Liu, Y., 2017. Vitamin E deficiency depressed fish growth, disease resistance, and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Referring to NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling. *Fish Shellfish Immunol* 60, 219–236. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.11.044>

Pietsch, C., Vogt, R., Neumann, N., Kloas, W., 2008. Production of nitric oxide by carp (*Cyprinus carpio* L.) kidney leukocytes is regulated by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 150, 58–65. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2008.03.003>

Pontes, T.C., Brito, J.M. de, Wernick, B., Urbich, A.V., Panaczevicz, P.A.P., Miranda, J.A.G., Furuya, V.R.B., Furuya, W.M., 2021. Top-sprayed phytase enhances the digestibility of energy, protein, amino acids and minerals, and reduces phosphorus output in Nile tilapia fed all-vegetable diets. *Aquac Res* 52, 6562–6570. <https://doi.org/10.1111/ARE.15527>

Pontes, T.C., França, W.G., Dutra, F.M., Portz, L., Ballester, E.L.C., 2019. Evaluation of the Phytase Enzyme in Granulated and Liquid Forms for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de Zootecnia* 158–163. <https://doi.org/10.21071/az.v68i261.3951>

Rodrigues, E.J.D., Ito, P.I., Ribeiro, L.F.M., de Carvalho, P.L.P.F., Xavier, W. dos S., Guimarães, M.G., Junior, A.C.F., Pezzato, L.E., Barros, M.M., 2023. Phytase Supplementation under Commercially Intensive Rearing Conditions: Impacts on Nile Tilapia Growth Performance and Nutrient Digestibility. *Animals* 13. <https://doi.org/10.3390/ani13010136>

Rodrigues, E.J.D., Ito, P.I., Ribeiro, L.F.M., de Carvalho, P.L.P.F., Xavier, W. dos S., Guimarães, M.G., Junior, A.C.F., Pezzato, L.E., Barros, M.M., 2022. Phytase Supplementation under Commercially Intensive Rearing Conditions: Impacts on Nile Tilapia Growth Performance and Nutrient Digestibility. *Animals* 2023, Vol. 13, Page 136 13, 136. <https://doi.org/10.3390/ANI13010136>

Xu, S. De, Zheng, X., Dong, X.J., Ai, Q.H., Mai, K. Sen, 2022. Beneficial effects of phytase and/or protease on growth performance, digestive ability, immune response and muscle amino acid profile in low phosphorus and/or low fish meal gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) diets. *Aquaculture* 555, 738157. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738157>

Younus, H., 2018. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)* 12, 88.

Zheng, H., Guo, Q., Duan, X., Xu, Z., Wang, Q., 2019. l-arginine inhibited apoptosis of fish leukocytes via regulation of NF- κ B-mediated inflammation, NO synthesis, and anti-oxidant capacity. *Biochimie* 158, 62–72. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2018.12.010>