

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Thaís Cristina de Oliveira
Zootecnista

AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E RESPOSTAS DE ESTRESSE
DE TILÁPIAS, *Oreochromis niloticus* ALIMENTADAS COM
β-GLUCANO

Dracena

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Thaís Cristina de Oliveira
Zootecnista

AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E RESPOSTAS DE ESTRESSE
DE TILÁPIAS, *Oreochromis niloticus* ALIMENTADAS COM
 β -GLUCANO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Tecnológicas – Unesp,
Câmpus de Dracena como parte das
exigências para conclusão do curso.

Orientador: Profa. Dra. Jaqueline Dalbello Biller
Coorientadora: Ingrid Camargo dos Reis

Dracena
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Dracena



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
UNESP – CÂMPUS DE DRACENA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E RESPOSTAS DE ESTRESSE DE TILÁPIAS,
Oreochromis niloticus ALIMENTADAS COM β -GLUCANO.

Modalidade: Trabalho de pesquisa;

Autor: Thaís Cristina de Oliveira

Orientadora: Jaqueline Dalbello Biller

Co-orientadora: Ingrid Camargo dos Reis

Número de Créditos: 15

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 20/06/2023

Documento assinado digitalmente
gov.br
Ingrid Camargo dos Reis
Data: 20/06/2023 14:05:00
Validar em: <https://at.dia.ic.gov.br>

Ingrid Camargo dos Reis

Flávia Thomaz Verechia
Rodrigues

Basia Schlichting
Moromizato

DEDICATÓRIA

Aos meus preciosos pais, que acompanharam cada dia dessa trajetória, o incentivo constante do meu pai Waldomiro e a dedicação incondicional da minha mãe Angela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar pela força e pela coragem que cada dia me proporcionou e por estar sempre presente em minha vida.

À minha avó Jovelina (*in memorian*), pelo amor, por me escutar e me abraçar mesmo não estando mais aqui.

Aos meus pais Angela e Waldomiro, que todos os dias me deram força para superar as dificuldades. Obrigada por fazerem o possível e impossível por mim, com todo amor do mundo.

Aos meus irmãos, João e Felipe, por todo suporte, todo amor, por todos os momentos vividos e pelas alegrias.

À minha avó Cida, se dedicou totalmente a mim quando mais precisei, por sempre me aconselhar e ser meu ponto de paz.

Aos meus amigos Jessica, Johanna e Alexandre, por se fazerem presentes mesmo com a distância, por serem meu ombro amigo e ter a certeza que sempre vou ter um lugar para voltar.

À minha orientadora, professora Dra. Jaqueline Biller, por todos os ensinamentos ao longo desses anos, por sempre estar disposta a me ajudar, aconselhar e vibrar junto pelas conquistas.

À minha coorientadora e amiga Ingrid Reis, pela amizade, carinho, por toda força e atenção. Por aceitar ser membro da minha banca avaliadora e dividir esse momento tão especial comigo. Minha eterna gratidão.

Ao Laboratório de Imunologia Animal – LIA, pela oportunidade de desenvolver este projeto, em especial a Basia por toda atenção, carinho e sempre disposta a me ajudar.

Ao grupo PET ZOO, por todo o crescimento pessoal e profissional, que me fizeram ser uma pessoa muito melhor. Em especial a professora Dra. Carolina pelos ensinamentos e por todo o carinho dedicado.

Aos professores da FCAT, por serem profissionais incríveis, sempre dispostos a dar todo o suporte necessário, por toda dedicação e paciência durante a minha graduação. Em especial a Prof^a Dra. Flavia, pelos ensinamentos, amizade e por aceitar ser membro da minha banca avaliadora.

À República Apartadas, por serem meu alicerce, por todo amor, cumplicidade, irmandade, respeito e dedicação. Por terem dividido comigo os melhores anos da minha vida. Minha família de coração.

À minha amiga Maysa, por todos os anos compartilhados, por ser minha irmã de vida.

À XVIII Turma de Zootecnia, em especial aos meus amigos Lana, Fabiana, Eduardo, Raphael, Layra e Taína, pelas trocas e ensinamentos.

E por fim, a FCAT, a todos os funcionários, professores, diretores e coordenadores, por fazerem ser um lugar de aprendizado, respeito, amor e união.

“Um bom plano executado rigorosamente agora é
melhor que um plano perfeito executado na
próxima semana.”

(George Patton).

RESUMO

Há evidências de que a administração do β -glucano pode ativar de forma eficaz diversos mecanismos de defesa, entretanto não se sabe se induz alguma resposta de estresse. Esta proposta tem como objetivo analisar parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápias alimentadas com β -glucano. O experimento foi conduzido no Biotério do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, da UNESP, Campus de Dracena. Um total de 120 juvenis de tilápias, *Oreochromis niloticus* (50 g) foram distribuídas em 10 aquários de vidro com volume útil de 80 L, dispostos num sistema de circulação fechada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, com 4 tratamentos (2 dietas: controle e 0,1% β -glucano x 2 tempos de amostragem: 7 e 15 dias de experimento) com 5 repetições cada (as amostragens foram realizadas no mesmo aquário, com diferentes tempos). Nos dias 7 e 15 dias de experimento, peixes de todos os tratamentos foram amostrados, anestesiados em solução alcoólica de eugenol (0,1g L⁻¹), e 2 peixes de cada caixa (n=10) foram submetidos à retirada de sangue, que foi utilizado para avaliação das respostas imunes (atividade de lisozima) e para os parâmetros hematológicos, foram determinados a porcentagem de hemácias no sangue por meio de centrifugação dos capilares, o número de eritrócitos pela câmara de Neubauer, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio, contagem total e diferencial das células de defesa. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tuckey (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.0. As variáveis expressas no trabalho, apresentaram resultados significativos apenas para o sistema imunológico (sistema imune inato) de tilápias. Concluindo que o β -glucano não causou mudanças significativas nas variáveis hematológicas.

Palavras-chave: hematologia, lisozima, peixe, imunologia.

ABSTRACT

There is evidence that the administration of β -glucan can effectively activate several defense mechanisms, however it is not known if it induces a stress response. This proposal aims to analyze hematological and immunological parameters of tilapia fed with β -glucan. The experiment was carried out in the vivarium of the Laboratory of Immunology and Molecular Biology of the Faculty of Agricultural and Technological Sciences, of UNESP, Dracena Campus. A total of 120 tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (50 g) were distributed in 10 glass aquariums with a usable volume of 80 L, arranged in a closed circulation system. The experiment was carried out in a completely randomized design, in a 2 x 2 factorial scheme, with 4 treatments (2 diets: control and 0.1% β -glucan x 2 sampling times: 7 and 15 days of experiment) with 5 repetitions each (the samplings were carried out in the same aquarium, with different times). On days 7 and 15 of the experiment, fish from all treatments were sampled, anesthetized in alcoholic eugenol solution (0.1g L⁻¹), and 2 fish from each box (n=10) were subjected to blood withdrawal, which was used to evaluate immune responses (lysozyme activity) and for hematological parameters, the percentage of red blood cells in the blood was determined by means of capillary centrifugation, the number of erythrocytes by the Neubauer chamber, hemoglobin concentration, mean corpuscular volume, total and differential count of defense cells. The results obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means compared by Tuckey's test (5%), using the SAS statistical program, version 9.0. The variables expressed in the work showed significant results only for the immune system (innate immune system) of tilapia. Concluding that β -glucan did not cause significant changes in hematological variables.

Keywords: hematology, lysozyme, fish, immunology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	18
Figura 2 - Células do sangue periférico de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) coradas com panótico rápido. Eritrócito (A), neutrófilo (B), CGE (C), monócito (D), leucócito imaturo (E), linfócito típico (F), linfócito atípico (G), eosinófilo jovem (H), trombócitos (I).	22
Figura 3 - Coleta de sangue por punção de vasos caudais	29
Figura 4 - Biometria	29
Figura 5 - Coloração das extensões sanguíneas	31
Figura 6 - Placa de acrílico tipo Elisa	32
Figura 7 - Contagens de colônias	34
Figura 8 - Atividade de lisozima do soro de tilápias (média) alimentados com β -glucano. teste de Tukey ($p < 0,05$).	37
Figura 9 - Atividade bactericida do soro de tilápias (média) alimentados com β -glucano. teste de Tukey ($p < 0,05$)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição Nutricional e centesimal das dietas experimentais.....28

Tabela2- Variáveis hematológicas de tilápias alimentadas com dieta controle e suplementadas com 0,1% de β -glucano em 7 e 15 dias ($P < 0,05$).....35

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFC	Unidade Formadora de Colônia
pH	Potencial Hidrogeniônico
NE	Número de Eritrócitos
CGE	Célula Granulocítica Especial
HB	Hemoglobina
HT	Hematócrito
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
$\pm$	Mais-menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

β -glucanos são polímeros de glicose encontrados nas paredes de fungos, tais como *Candida albicans* e levedura *Saccharomyces Cerevisiae*, que apresentam diferentes pesos moleculares e graus de ramificação, que determinam sua efetividade como imunomoduladores. Os extratos de β -glucano com estrutura composta por cadeia principal com unidades de glicose com ligação β 1-6 e cadeias laterais com ligações β 1-3 facilitam a estimulação dos mecanismos de defesa não específica dos animais, incluindo os peixes (Robertsen et al., 1990; Figueras et al., 1998), sendo este o mais utilizado como aditivos alimentares para organismos aquáticos (Vallejos-Vidal et al., 2016; Sakai, 1999).

Os protocolos de imunomodulação do β -glucano observados na literatura, na sua maioria, preconizam a administração antes de eventos estressantes (desafios) (Barros et al., 2014; El-Boshy et al., 2010; Falco et al., 2007), por outro lado, há indicações pelas indústrias alimentícias de administração também após episódios estressantes (fatores climáticos, manejo estressante, vacinação, aparecimento de doenças), fato que ainda não está bem elucidado. Os protocolos de imunomodulação deveriam levar em consideração a característica da molécula dos imunoestimulantes, bem como as condições de cultivo a fim de promover a melhor resposta do organismo. O β -glucano é considerado um PAMP (Padrão Molecular Associado a Patógeno), que após reconhecimento por receptores em células competentes, estimula o sistema imune, promovendo precocemente, o aumento de diversos compostos de defesa (Miest et al., 2012; Falco et al., 2014), e por isso é indicado para alimentação antes de manejos estressantes (manejo imunossupressor que pode levar ao aparecimento de doenças). Por outro lado, a administração do β -glucano após episódios estressantes pode causar imunossupressão, pois a presença dessa molécula, seria um estímulo extra para o organismo quando associado a outros manejos ou episódios, e conseqüentemente não haverá diminuição dos efeitos negativos do estresse, e sim prejuízo orgânico e maior dificuldade ao retorno à homeostase. Uma hipótese, seria a administração de

dietas com outras moléculas imunoestimulantes, como mananoligossacarídeo, vitaminas e antioxidantes.

A tilápia, *Oreochromis niloticus*, possui importantes características zootécnicas que o tornaram um dos peixes mais importantes da aquicultura brasileira, entretanto devido ao cultivo intensivo, apresenta ampla susceptibilidade a agentes patogênicos e oportunistas, causa de grandes perdas econômicas (IBGE, 2014; Wang et al., 2016). Frente à essas perdas, o uso de imunoestimulantes na prevenção de doenças, que melhoram o mecanismo de defesa não específico, ativando assim, a proteção precoce contra infecções, é uma alternativa ao uso de antibióticos, refletindo em diminuição da mortalidade (Anderson, 1992; Sakai, 1999; Sahoo e Mukherjee, 2001; Selvaraj et al., 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápias alimentadas com β -glucano, durante 7 e 15 dias.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar concentração de hemoglobina, número de células totais e diferenciais;
- Analisar atividade da lisozima;
- Avaliar atividade bactericida do soro das tilápias.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Modelo Biológico

As tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1), foram inseridas há mais de 40 anos no Brasil e são originárias do continente africano e Oriente Médio (BILLER-TAKAHASHI et al., 2014). Entre os 15 maiores produtores do mundo, o Brasil é um dos países encontrados, de acordo com a FAO. A produção de peixes cultivados no país é a atividade zootécnica que mais vem crescendo nos últimos 10 anos gerando 1 milhão de empregos diretos e indiretos e uma crescente taxa superior a 10% ao ano, movimentando cerca de R\$ 4 bilhões/ano (PEIXE BR, 23).

Pertencentes à ordem Perciformes, família Cichlidae e subfamília Pseudocrenilabrinae, gênero *Oreochromis*, envolvem diversas espécies. Segundo Popma & Lovshin (1995), as tilápias de importância comercial são divididas em três grupos, de acordo, com seu comportamento reprodutivo: *Tilápia spp.* (incubam seus ovos em substratos); *Oreochromis spp.* (incubam os ovos na boca da fêmea) e *Sarotherodon spp.* (incubam na boca dos machos ou de ambos).

Figura 1 - Ilustração da Tilápia (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: <https://pisciculturamaravilhosaesp.wordpress.com/1-tilapia-do-nilo/>

As tilápias apresentam hábitos alimentares que vão do herbívoro (alimenta-se de plantas), fitoplanctófago (alimenta-se de algas), omnívoro (alimenta-se de diferentes tipos de alimento) ao detritívoro (alimenta-se de restos de organismos). A espécie mais cultivada no Brasil (Tilápia Nilótica), possui um hábito alimentar fitoplanctófago porém se alimenta normalmente com rações artesanais e comerciais.

A espécie suporta bem, amplas variações de pH, baixas condições de qualidade de água e concentrações de oxigênio dentro do limite, altos valores

de salinidade e apresentam uma certa resistência a diversas enfermidades (Zaniboni Filho, 2004), o que leva a ser uma das espécies mais indicadas para a criação intensiva. As características da espécie, inclui, como um dos peixes de maior potencial para a piscicultura mundial (FITZSIMMONS, 2000; SHELTON, 2002). A espécie se destaca por suas interessantes características zootécnicas, como crescimento rápido e fácil adaptação ao ambiente de criação (Galli & Torloni, 1986). Além de todas as características, o produto final da espécie apresenta requisitos típicos preferidos pelo mercado consumidor, como a carne branca de excelente qualidade nutricional (OLIVEIRA et al., 2007), sabor delicado, fácil filetagem e ausência de espinhas em Y (Jory et al., 2000).

3.2 Hematologia da Tilápia do Nilo

O estudo da composição e função dos complementos do sangue de peixes é fundamental na avaliação das condições fisiológicas, bioquímica e patológica (TAVARES-DIAS, 2003). O sangue dos peixes teleósteos é composto por eritrócitos (células vermelhas), leucócitos (células brancas). O que pode ser visualmente constatado após a centrifugação do sangue, que separa a série vermelha da série branca do sangue (DAMATTA et al., 2009). Além destas células, os trombócitos também fazem parte do sangue, sendo células responsáveis pelo processo de coagulação sanguínea.

Os eritrócitos são as células mais numerosas no sangue, contêm a hemoglobina que possui a função de transportar o O_2 e parte do CO_2 no sangue. Qualquer deficiência no eritrócito será entendida como uma falta de O_2 nos tecidos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Os eritrócitos maduros de peixes teleósteos possuem formato elíptico, esférico ou oval, com núcleo central de cromatina condensada, o citoplasma tem aparência homogênea e clara podendo conter quantidade variável de pontos claros rarefeitos ou vacúolos associados à degeneração de organelas celulares (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Mudanças morfológicas nestas células geralmente são associadas à resposta orgânica frente a uma anemia.

Os trombócitos possuem além do papel de hemostasia, importante participação no mecanismo de defesa orgânica pela sua presença nos

processos de coagulação e inflamação, além da atividade fagocitária nos processos de infecção (TAVARES-DIAS, 2003; MARTINS et al., 2004).

Os leucócitos são células responsáveis pela defesa humoral e celular dos peixes, usando a via sanguínea para impedir possíveis infecções e danos teciduais. As linhagens celulares que compõem a série leucocitária podem ser distintas através da presença ou ausência de granulações, características morfológicas e suas propriedades tintoriais, quando em contato com corantes específicos (SATAKE; PADUA; ISHIKAWA, 2009). Os leucócitos usualmente observados no plasma de peixes são linfócitos, monócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), e participam da resposta imunológica (FERNANDEZ et al., 2002).

Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, possibilitando a produção de anticorpos, aumentando a capacidade citotóxica, operando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune (YOSHINAGA et al., 1994). São células de formato arredondado, com citoplasma basofílico, sem granulações e núcleo arredondado com a cromatina bastante densa (SILVA et al., 2012).

Os linfócitos são divididos em dois grupos de populações, conhecidos como linfócitos B e T. Os linfócitos B se distinguem em plasmócitos que são os linfócitos B ativados, em células de memória e auxiliam na resposta imune humoral. Já os linfócitos T se diferenciam em linfócitos T auxiliares, que diferenciam antígenos específicos ligados à marcadores e liberam mensageiros químicos que estimulam a atividade de células como os fagócitos, e linfócitos T citotóxicos, são encarregados na defesa do sistema imune contra microrganismos intracelulares (bactérias e vírus) e células tumorais, através da apoptose para evitar a dissipação do agente pelas células vizinhas (TIZARD, 2002), porém eles precisam de facilitadores MHC de classe 1 para fazer o reconhecimento do antígeno para assim, promover a morte celular do invasor (GOLDSBY et al., 2002).

Os neutrófilos, são as primeiras células envolvidas no início de inflamação nos peixes (MANNING, 1994). Estas células possuem a capacidade de fagocitar e, no decorrer da resposta imune, a maioria possui o material ingerido no seu fagossomo (FERNANDEZ et al., 2002). Os neutrófilos são

ativados por estímulos, como contato bacteriano, quimiocinas e citoxinas. Além disso eles possuem a função fagocitária e sobre degranulação, liberando grânulos no meio extracelular (CRUVINEL et al., 2010). Em situações de estresse, a quantidade dessas células pode aumentar significativamente, em 24 horas (FALCON, 2007).

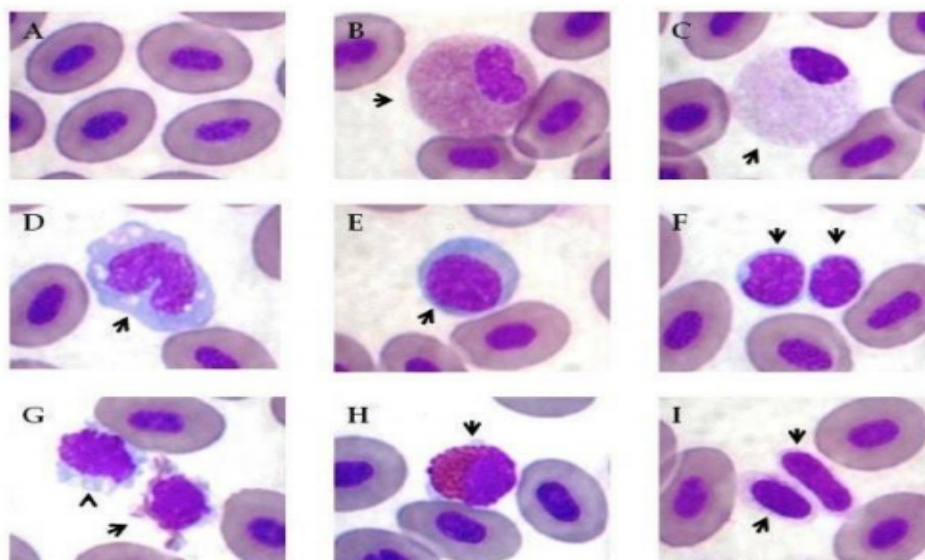
Os monócitos são células predominantemente grandes, arredondadas e com citoplasma basofílico (Tavares-Dias et al., 2002). São provavelmente as células sanguíneas mais importantes da resposta imune, pela produção de citocinas e são as células primárias na apresentação dos antígenos em teleósteos. As células relacionadas com a fagocitose e na destruição de patógenos, fazem o papel de interligar o sistema imune não específico ao específico, sendo isolados do sangue, órgão (rim) ou da cavidade peritoneal (VALLEJO et al., 1992; SHOEMAKER et al., 1997). Como as principais características destacam-se a habilidade de ingerir material estranho ao organismo, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos (FALCON, 2007).

Os eosinófilos e basófilos são raramente encontrados no sangue periférico de peixes, mas participam da resposta imune, sendo encontrados com a maior frequência no trato intestinal e nas brânquias, e na corrente sanguínea em ocasiões de infestação parasitária (SILVA; LIMA; BLANCO, 2012). A função dessa célula nos peixes não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que estas intervêm nos processos de inflamação crônica e na defesa celular mediante a degranulação. Os basófilos são considerados ausentes na maioria dos peixes (HINE, 1992).

Alterações nos componentes sanguíneos dependem de fatores endógenos como sexo, peso, comprimento, estado nutricional e doenças, bem como de fatores externos, tais como: temperatura, ciclo sazonal, estresse, poluentes e entre outros. (RANZANI-PAIVA et al., 2013). A produção intensiva é um dos fatores que prejudica a piscicultura, por conta do manejo inadequado acaba gerando estresse e suprimindo esses animais. Para tentar diminuir os efeitos dos fatores endógenos e externos, os imunoestimulantes podem atuar

sobre o sistema imune, potencializando a produção das células de defesa (SOUZA, 2010).

Figura 2 - Células do sangue periférico de tilápia (*Oreochromis niloticus*) coradas com panótico rápido. Eritrócito (A), neutrófilo (B), CGE (C), monócito (D), **leucócito imaturo** (E), linfócito típico (F), linfócito atípico (G), eosinófilo jovem (H), trombócitos (I).



3.3 Estresse de peixe

O estresse é o estado produzido por fatores ambientais ou não, que provoca respostas adaptativas no animal frente a uma alteração da função normal (Brett, 1958); Kebus et. al., 1992). A resposta ao estresse pode ser dividida em três categorias, sendo elas, o reconhecimento de uma falha na homeostase, a resposta ao estresse propriamente dita e as consequências do estresse (MOBERG, 1985). Cada uma das categorias causa determinados efeitos, que se inicia com a compreensão de estressor pelo sistema nervoso. Como resultado os indicadores usados, ocorrem variações nas concentrações de cortisol plasmático (resposta primária), glicose (resposta secundária) e nas características hematológicas responsáveis pela imunossupressão do organismo (YADA e NAKANISHI, 2002).

A ação destes hormônios em específicos órgãos, pode resultar em mudanças fisiológicas e bioquímicas. O estímulo a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado, acabam aumentando os níveis de glicose no sangue, reduzindo as proteínas musculares e subindo os batimentos cardíacos (SMITH,

1982; PERRY & LAURENT, 1993). Além de causar modificações no animal e no lote, sendo determinada pela baixa da resistência dos peixes as enfermidades, isso acaba ocorrendo pois há uma diminuição no número de leucócitos, levando conseqüentemente a diminuição do número de linfócitos (linfocitopenia) e o aumento no número de neutrófilos circulantes (neutrofilia) (MAZEAUD et al. 1977). Pode acarretar a queda de crescimento, comprometer a reprodução, além de uma queda na resistência as doenças (BARTON & IWAMA, 1991).

O estresse ocorre de duas maneiras diferentes, de forma aguda e crônica. O primeiro ocorre em manejos, como, biometrias e transportes, que são considerados estresses rápidos. O segundo tipo ocorre de forma permanente, como, pH incorreto, baixo nível de oxigênio dissolvido na água, que leva ao baixo crescimento e ganho de peso. Dentro desse tipo, o estresse social é particularmente importante para tilápia-do-Nilo (GONÇALVES, 1993). Ele pode ser considerado o estresse frente a estímulos sociais ou de agrupamento (FERNANDES & VOLPATO, 1993).

É importante conhecer a ação do estresse em peixes pois segundo a evolução, tanto os patógenos quanto seus hospedeiros evoluíram juntos, acarretando um equilíbrio entre eles. Quando o animal entra em estado de estresse, esse equilíbrio é rompido, e os organismos que viviam, sem promoverem enfermidade em seus hospedeiros, se deparam com as barreiras imunológicas reduzidas. Com isso surgem as enfermidades oportunistas, causadas por parasitos e bactérias, aguda ou prolongadamente estressados, seja por classificação, transporte, mudanças de temperaturas e pluviosidade, má qualidade de água, mal estado nutricional dentre outras (Lively et al., 1990).

3.4 Sistema imune

O sistema imune tem função protetora, defendendo o organismo animal contra patógenos, células malignas e toxinas (REIS, 2021). Sua eficiência pode sofrer interferência de diversos fatores, tais como agentes estressores, micro e macronutrientes, sazonalidade, ações hormonais, tempo de exposição ao agente estressor, tudo isso pode levar a respostas positivas ou negativas do sistema (FLETCHER, 1997; VERLHAC; GABAUDAN, 1997).

Classifica-se a resposta imune em dois tipos, a inata (não específica), que age de maneira rápida e constante diante de agentes estressores, e a resposta adaptativa (específica), que apesar de responder lentamente, atua sobre um agente específico e a partir disso gera memória imune (BEN-SHAANAN *et al.*, 2016). Mesmo com essa separação de classes dentro do sistema imune, quando o organismo é atingido por um patógeno, o sistema imune atua de forma global para combater o estressor, e esses mecanismos podem agir juntos ou separados (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

A resposta adquirida, forma anticorpos e memória imunológica, por meio da identificação dos patógenos pelas células presentes no sistema imune, essa resposta também se divide, entre humoral e celular, que agem em conjunto (SECOMBES, 1996). A resposta adquirida conta com os linfócitos B e T, onde os linfócitos B se dividem, e dão origem aos plasmócitos e células de memória, que produzem anticorpos específicos contra os antígenos, as células de memória respondem rapidamente quando expostas aos antígenos. E os linfócitos T, atuam reconhecendo os antígenos que entram em contato com os receptores dos macrófagos (células fagocíticas), fazendo com que eles se multipliquem (BILLER, 2008).

O sistema inato é composto por barreiras físicas, como o tegumento (pele e muco), células dendríticas, macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, citocinas, lisozima e sistema complemento, que agem fagocitando e exterminando agentes estressores (LOPES, 2018). O sistema inato é dividido em imunidade humoral e celular (BILLER, 2008).

A imunidade celular é representada por células de defesa, tais como trombócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos e células citotóxicas, que tem origem de produção em tecidos linfoides, sendo eles rim, baço e timo (EVANS, 1997). Já a imunidade humoral é caracterizada por substâncias não específicas presente em fluidos corpóreos, tais como muco, soro e ovos de peixes, contamos com a lisozima, interferon, proteína C reativa, transferrina, lectina e sistema complemento. E agem inibindo a proliferação de patógenos no organismo animal (BILLER, 2008).

O sistema complemento se destaca dentro dos mecanismos de respostas imunes, pois age na linha inata e adquirida, sendo composto por um conjunto de proteínas séricas e de membrana (RIBEIRO, 2019).

A lisozima tem uma função relevante, por ser uma enzima com ação bactericida, atuando sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas, com ação antiviral e antiparasitária, se encontra em muco, saliva e sangue. Em peixes, a lisozima é produzida em grande quantidade em neutrófilos, monócitos e macrófagos, tendo como o órgão de principal secreção os rins anteriores, seguido por trato digestório, baço, muco, soro, brânquias, fígado e músculo (MURRAY; FLETCHER, 1976; LIE *et al.*, 1989; PALAKSHA *et al.*, 2008; RIBEIRO, 2019).

3.5 β -glucanos

Os β -glucanos são formados de polissacarídeos naturais que são elementos fundamentais da parede celular e que podem servir como armazenamento de energia em bactérias, fungos, leveduras, algas e plantas (STIER *et al.*, 2014). O mais usado como imunoestimulante na aquicultura é o que possui origem fúngica, que se origina da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

Os β -glucanos podem ser distintos pela forma na qual as moléculas de glicose estão ligadas entre si. Os polissacarídeos em sua maioria, possuem moléculas de glicose que estão juntas por ligações α -1,4, dando uma estrutura linear, enquanto nos β -glucanos estas moléculas unem-se por ligações β -1,3 e β -1,6 dando uma estrutura em forma de hélice, esta composição estrutural é identificada por componentes do sistema imune que tem como resultado a ativação deste sistema (Robertsen *et al.*, 1990). Os imunoestimulantes podem promover respostas positivas mesmo quando usados isoladamente, aumentando a atividade de mecanismos de defesa não específicos, como a intensificação das células fagocíticas ou das células citotóxicas (ANDERSON, 1992).

Os macrófagos possuem receptores específicos para β -glucanos, que ao se ligarem ao polissacarídeo estimulam a atividade fagocítica e aumentam a atividade respiratória do leucócito e, conseqüentemente, elevam a capacidade do organismo em eliminar patógenos (Jorgensen e Robertsen, 1995). Além disso, os β -glucanos amplificam a produção de proteínas líticas como a lisozima e as proteínas do sistema complemento (Paulsen *et al.*, 2001; Nakao *et al.*, 2011).

Para a utilização e efeito eficaz destes imunoestimulantes são necessários alguns fatores, como, tempo de exposição, método de administração, condição fisiológica do animal e espécie do animal (Shakya et al., 2014; Harikrishnan et al., 2011).

A via de administração do β -glucano pode ocorrer de diversas formas, tais como, injeção, imersão na água ou suplementado a dieta. O efeito observado em espécies distintas é parecido (PETIT; WIEGERTJES, 2016). O método via oral que ocorre a incorporação da substância ao alimento, é o mais utilizado e o mais prático (Shakya et al., 2014; Chagas et al., 2014; Chakraborty et al., 2011), menos estressante e permite que um número maior de peixes seja tratado com um manejo menos incômodo e menos trabalhoso (Shakya et al., 2014; Selvaraj et al., 2015).

O β -glucano é considerado um PAMP quando oferecido em dietas para animais, pois é reconhecido, fagocitado e processado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (GOODRIDGE et al., 2011). A fagocitose é essencial para acabar com os patógenos e para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são essenciais na devastação de invasores (PETIT; WIEGERTJES, 2016).

O β -glucano pode servir como redutor das respostas de estresse, já que se mostrou positivo na redução da concentração de cortisol (GARCIA, 2014). Por tanto o uso de imunoestimulantes é uma forma profilática ao uso de fármacos (Biller-Takahashi, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Condução do Experimento

O experimento foi conduzido no Biotério do Laboratório de Imunologia e Biologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, da UNESP, Campus de Dracena. Foram utilizados 10 aquários de vidro com volume útil de 80 L, dispostos num sistema de circulação fechada e aeração forçada através de sopradores de ar e pedras porosas com aquecedores e termostatos para manutenção da temperatura da água constante (cerca de 28°C). A cada dois ou três dias, a matéria orgânica depositada no fundo dos aquários foi removida através de sifonamento com uma mangueira de borracha.

4.2 Animais

Para a realização do experimento foram utilizados 120 juvenis de tilápias (*Oreochromis niloticus*) com peso inicial médio de 50g. Os peixes foram adquiridos no início do experimento e distribuídos em aquários de vidro, dispostos em sistema de circulação fechada. Os peixes passaram por anestesia com solução alcoólica de eugenol (0,1g L⁻¹) a fim de serem pesados, medidos e distribuídos na proporção de 10 peixes por aquário de forma aleatória em 10 aquários de vidro.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais, no dia 22/11/2022, registrada com o nº: 22/2022.R1 - CEUA. Seguindo as normas segundo a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece normas para criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica.

4.3 Dieta

Para o experimento, foram confeccionadas duas dietas: Uma dieta controle (livre de β -glucano) e uma dieta experimental (0,1% de β -glucano). As dietas foram armazenadas em potes plásticos. Os peixes receberam dieta comercial duas vezes ao dia até a saciedade aparente, durante o período de aclimação (10 dias) e período experimental (28% PB e 3.600 kcal EB kg⁻¹) em partículas menores que 0,8 mm.

Tabela 1. Composição Nutricional das dietas experimentais.

Ingredientes	Ração	
	% Controle	% β -glucano
Farelo de soja	34,218	34,218
Farinha de vísceras	18,000	18,000
Milho	17,511	17,511
Farelo de trigo	9,000	9,000
Quirera de arroz	8,000	8,000
Farinha de carne e ossos	6,686	6,686
Protenose	3,446	3,446
Fosfato bicálcico	0,755	0,755
Óleo de soja	1,000	1,000
Premix	0,500	0,500
Antifúngico	0,200	0,200
Sal	0,300	0,300
DL-metionina	0,168	0,168
Antioxidante	0,050	0,050
Calcário	0,167	
Betaglucano		0,167
Total	100,00	100,000

Fonte: Autora.

4.3 Coleta material biológico

Para realizar a coleta foi necessário preparar o material por meio da lavagem de vidraria, pesagem de reagentes, enumeração de microtubos, tubos e criotubos, além de organizar o laboratório e o biotério.

Para as análises imunológicas para avaliação de variáveis hematológicas (hemograma, leucograma e índices hematimétricos), foi coletado aproximadamente 2 mL de sangue através da punção do vaso caudal dos peixes anestesiados (Figura 3). Sendo destinado para confecção das extensões sanguíneas e a seguir, o sangue foi transferido para tubos de Eppendorf e colocados no gelo. A separação das frações do sangue foi realizada pela centrifugação (3.000 rpm, à 10°C, 10 minutos) do sangue logo após a coleta, para separação do plasma, e, após uma hora à temperatura ambiente, para separação do soro.

Figura 3 – Coleta de sangue por punção de vasos sanguíneos caudais.



Fonte: Autora.

Figura 4 – Biometria



Fonte: Autora.

4.4 Variáveis hematológicas

No sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos (NE), concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio

dos eritrócitos (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e, em extensões sanguíneas, foram determinadas a contagem total e diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, célula granulocítica especial (CGE) ou leucócito granular PAS (LG-PAS) e basófilo.

Amostras sanguíneas homogeneizadas foram introduzidas em capilares para micro-hematócrito e uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 g em centrífuga de micro-hematócrito e a avaliação foi feita com o auxílio da tabela de micro-hematócrito.

Para a contagem do número de eritrócitos, alíquotas de sangue de cada animal foram coletadas e diluídas. Após a homogeneização da solução a contagem foi feita na câmara de Newbauer.

Extensões sanguíneas de cada animal foram feitas em lâminas de vidro com extremidade fosca e foram deixadas para secar ao ar e submetidas à coloração de pelo Kit Panótico. A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. A contagem total dos leucócitos e trombócitos foi realizada por método indireto, pela quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas obtido na contagem total de células. Já a contagem diferencial de leucócitos foi quantificada contando-se 200 células e estimando para o total de leucócitos (Ishikawa et al., 2008).

$$\text{Leucócitos (por uL)} = \frac{\text{nº leucócitos} \times \text{nº total de eritrócitos (por uL)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

$$\text{Trombócitos (por uL)} = \frac{\text{nº trombócitos} \times \text{nº total de eritrócitos (por uL)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

Para o cálculo do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram utilizadas as seguintes fórmulas:

- $\text{VCM (fL)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Nº total de eritrócitos}}$

- $\text{HCM (pg/Célula)} = \frac{(\text{Hemoglobina}) \times 10}{(\text{N}^{\circ} \text{eritrócitos}) \times 10}$
- $\text{CHCM (g. dL-1)} = \frac{(\text{concentração de hemoglobina}) \times 100}{\text{Hematócrito}}$

Figura 5 – Coloração das extensões sanguíneas



Fonte: Autora.

4.5 Variáveis Imunológicas

4.5.1 Atividade da Lisozima

A atividade da lisozima foi verificada pelo método clássico de lisar uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* foi mensurada mediante redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (BECKER; HARTSELL, 1954). A análise foi realizada por ensaio turbidimétrico, segundo Chandan; Parry; Shahani (1965) com adaptações.

A partir da curva padrão, determinada utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha (foi adquirida?), foi quantificada e as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta. Após a determinação de curva de calibração, os soros de peixes de todos os tratamentos, inicialmente, passaram por tratamento térmico (banho a 56°C por 30 min) para inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo, assim, que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* fosse provocada exclusivamente por ação da lisozima. Assim, 10 µL soro de tilápias (em duplicata) foram depositados em microplacas, de acrílico estéril de 96 cavidades, em 30 µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2), após homogeneização, o soro foi

submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2, mantendo um volume final de 40 μL por cavidade. Em cada cavidade foram depositados 200 μL de suspensão de *M. lysodeikticus* (0,2% em tampão fosfato de sódio). A redução da densidade óptica, em 540 nm, foi avaliada entre diferentes tempos: 0, 10 e 20 minutos. A fim de observar a diminuição da absorbância no tempo. Os resultados em concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$ de amostra) foram obtidos a partir da redução da δ DO para cada volume de amostra avaliada, e os resultados em unidade de atividade (U mL^{-1}) foi determinada como a quantidade de enzima que produziu, em 540 nm, um δ DO de 0,001 min^{-1} (WON; KIM; PARK, 2004).

Figura 6 – Placa de acrílico tipo Elisa.



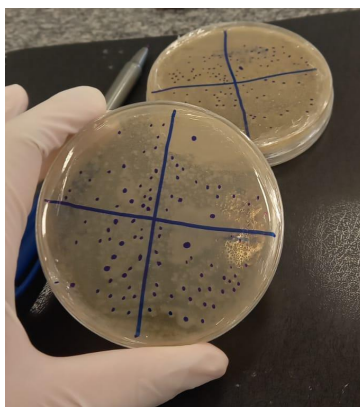
Fonte: Autora.

4.5.2 Atividade bactericida do soro

A avaliação da atividade bactericida do soro das tilápias seguiu a metodologia preconizada por Kajita et al. (1990), Rao et al. (2006), Aly et al. (2008), com modificações. Inicialmente uma cepa de *A. hydrophila*, previamente caracterizada, por testes bioquímicos (Bergey e Holt, 1994), foi semeada em caldo de digestão de soja e caseína (TSB), e incubada a 30° C por 24 horas. A suspensão bacteriana foi lavada e centrifugada (centrífuga 3000 g por 3 min, 4°C) em tampão fosfato estéril (PBS, composto por cloreto

de sódio 0,137 M, cloreto de Potássio 2,7 mM, fosfato monopotássico 1,5 mM, Fosfato dissódico 8,1 mM, cloreto de cálcio 0,9 mM, Cloreto de magnésio 0,49 mM, em água destilada Milli-Q qsp 1 litro) em pH 7,4. A suspensão bacteriana foi diluída em tampão PBS estéril na concentração de 1×10^8 UFC (escala de Mc Farland) (Vandepitte et al., 1993). Para avaliação da atividade bactericida do soro, 40 μ L da suspensão de *A. hydrophila* e 50 μ L de soro de tilápia foram incubados em microtubos estéreis por 1 hora a 37°C. Após este procedimento, uma alíquota deste homogeneizado foi depositada em placas de Petri. O meio de cultura utilizado foi triptona de soja (TSA) e o método de plaqueamento foi o “pour plate”. As cepas foram incubadas por 24 horas a 30°C. O grupo positivo consistiu de placas contendo bactérias em suspensão e tampão PBS no lugar do soro. Após o período de crescimento, o número de colônias foi quantificado em contador de colônia manual e os valores expressos em porcentagem nos grupos tratados em relação ao grupo positivo.

Figura 7 – Contagens de colônias.



Fonte: Autora.

4.6 Delineamento Experimental

Nos dias 7 e 15 dias de experimento, peixes de todos os tratamentos foram amostrados, anestesiados em solução de óleo de cravo ($1 \text{ g } 10 \text{ L}^{-1}$ de água), e 2 peixes de cada caixa ($n=20$) passaram por colheita de sangue para avaliação das respostas imunes (atividade de lisozima), hematológicas (hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio, contagem total e diferencial das células de defesa), e em seguida Foram individualmente

pesados em balança digital semianalítica com precisão de 0,01 g, medidos em ictiômetro para coleta de dados biométricos.

4.7 Análise Estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com em esquema fatorial 2 x 2, com 4 tratamentos (2 dietas: controle e β -glucano x 2 tempos de amostragem: 7 e 15 dias de experimento) com 5 repetições cada. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tuckey (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Variáveis Hematológicas

Aos 7 e 15 dias de experimento, os valores das variáveis sanguíneas avaliadas estavam dentro dos considerados normas para a espécie. Entretanto os peixes que foram alimentados com 7 e 15 dias de dieta contendo β -glucano apresentam menores valores de leucócitos em comparação com o grupo controle. No entanto os valores de hematócrito, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média dos tratamentos β -glucano (β) aos 7 e 15 dias se mostraram maiores quando comparadas ao tratamento controle.

Nas contagens de neutrófilos, monócitos e eosinófilos foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos (C7; β 7; β 15). Os peixes que foram alimentados com dieta controle durante 7 dias, apresentaram uma maior concentração de neutrófilos, monócitos e eosinófilos em comparação aos peixes alimentados com β -glucano por 7 e 15 dias. (Tabela 2)

Barros *et al.* (2014), incluiu na alimentação de tilápias 0,1% de β -glucano associada a 600 mg Vit C, pelos períodos de 45, 30, 15 e 7 dias, nos quais os animais que receberam o alimento suplementado por 7 dias apresentaram maior número de hemácias, hemoglobina e eritrócitos, mesmo após 4h de transporte. O que se levanta a possibilidade de influência do tempo de fornecimento na atividade do β -glucano, na hematologia.

Mohammadian *et al.* (2019) testaram em carpas, 0,5%, 1% e 1,5% de β -glucano associado a MOS, por 60 dias, e não observaram mudanças

significativas de hematócrito e hemoglobina entre os tratamentos, porém aos 30 dias a concentração de hematócrito e hemoglobina sofreram uma pequena alteração positiva nos grupos que receberam β -glucano, quando comparados ao controle, já aos 60 dias houve uma leve queda na concentração de hemoglobina dos grupos suplementados em relação ao controle.

Podemos reforçar que quanto maior o tempo de utilização do imunoestimulante, menor seu potencial de ação na hematologia, em seu trabalho Sousa (2010) utilizou o β -glucano a 0,03% por tonelada de ração em tilápias, por 90 dias, e não obteve médias com valores significativos em hematócrito e hemoglobina.

Tabela 2 – Variáveis hematológicas de tilápias alimentadas com dieta controle e suplementadas com 0,1% de β -glucano em 7 e 15 dias ($P<0,05$).

Variáveis		HB (g/dl ⁻¹)	HT (%)	Leucócitos (μl^{-1})	Linfócitos (μl^{-1})	Neutrófilos (μl^{-1})	Monócitos (μl^{-1})	Eosinófilos (μl^{-1})	Tombrocito (μl^{-1})	VCM (fL)	HCM pg/Célula	CHCM (g/dL)
7 dias	C	7.66	50.2	181269	100.923	42.109a	26.728a	9.232a	4.699	165.2	28.3	17.08
	β	8.52	51.5	138478	86.24	25.483ab	22.337ab	2.246ab	4.524	199.23	32.35	16.44
15 dias	C	5.92	37.9	104329	75.736	18.082b	8499b	1.090b	5.009	123.92	19.37	15.92
	β	6.4	41.8	98410	68.68	16.488b	9894b	1.799b	3.465	161.19	25.15	15.61

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: C= Dieta controle; β = Dieta com β -glucano;; HB= Hemoglobina; HT= Hematócrito. VCM=volume corpuscular médio; HCM=hemoglobina corpuscular média; CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média. Valores são médias seguidas do erros padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P<0,05$).

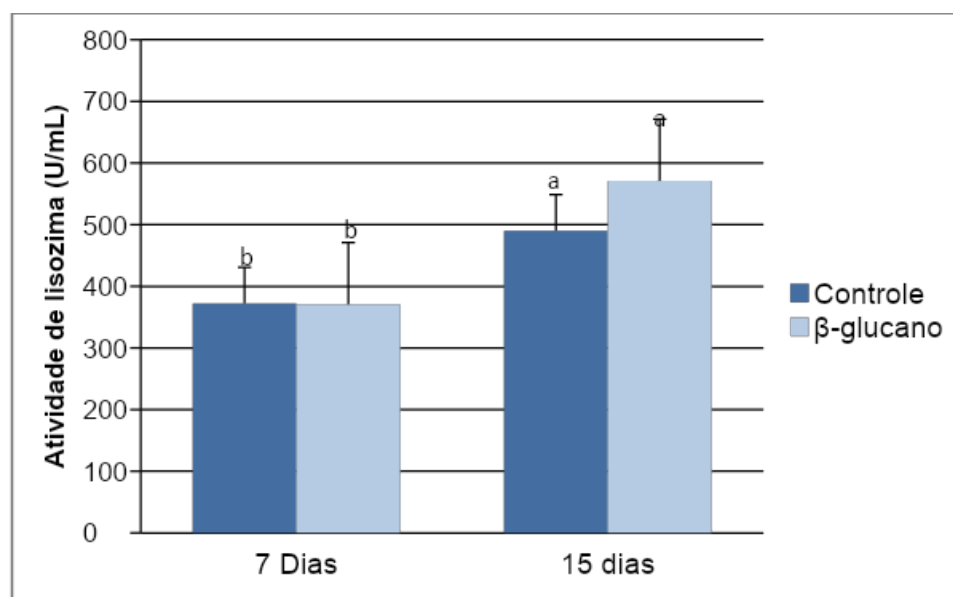
5.2 Atividade de Lisozima

A atividade de lisozima é de grande importância na defesa contra patógenos, é apresentada na Figura 8. Os peixes alimentados por 15 dias tiveram aumentos da atividade da lisozima nos grupos controle e experimental (0,1% de β -glucano), apresentando diferença significativa na dieta com β -glucano com 15 dias. A concentração do imunoestimulante não influenciou os peixes tratados por sete dias.

O sistema inato de defesa em peixes é considerado a primeira barreira para defesa contra patógenos. A lisozima atua na prevenção da aderência e colonização de microrganismo aos epitélios (ALEXANDAR e INGRAM, 1992).

Diversos autores relataram a melhora nas respostas imunológicas com aumento da atividade da lisozima e consequente aumento na atividade bactericida, como observado por YANO ET. At (1991) em *Cyprinus carpio* L. que receberam ração suplementada com 1,3 β -glucano; MATSUO e MIYZANO (1993) em truta arco-iris arraçadas por longo período com este imuno-estimulante; PAULSEN et al. (2001) em salmão do atlântico que receberam 1,3 β -glucano e lipopolissacarídeos bacterianos; SAHOO e MUKHERJEE (2001) em *labeo rohita* arraçadas com alimento suplementado com o mesmo imunoestimulante e BAGNI et al (2005) em *Dicentrarchus labrax* alimentadas por via oral 1,3 β -glucano.

Figura 8. Atividade de lisozima do soro de tilápias (média) alimentados com β -glucano. teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pela autora.

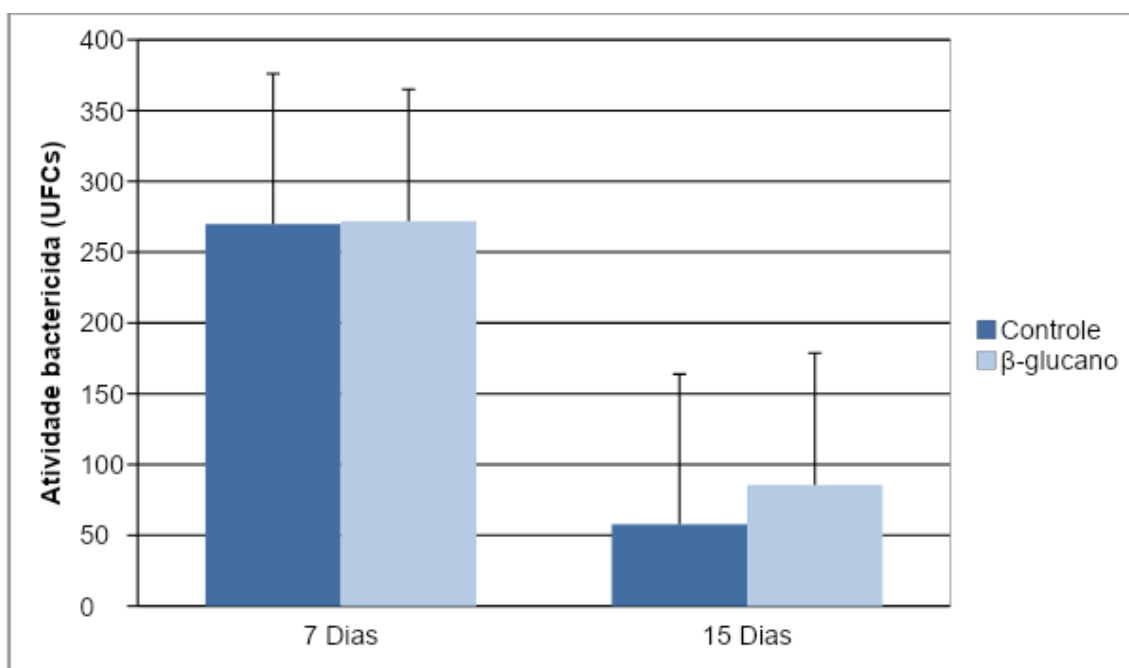
Legenda: valores são médias seguidas do erros padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

5.3 Atividade bactericida do soro

Os grupos controle e tratados apresentaram capacidade de destruir bactérias, entretanto a administração do imunoestimulante por sete ou 15 dias, não promoveu diferenças significativas. Houve um perfil de maior atividade com 7 dias, mas sem significado estatístico.

O soro de peixes de todos os tratamentos apresentou capacidade de destruir o crescimento da bactéria *A. hydrophila*. Entretanto, os peixes tratados não demonstraram diferenças significativas quando comparados com os peixes controle, embora fosse possível observar maior contagem de bactérias no soro dos peixes tratados com o imunoestimulante. A atividade bactericida do soro indica a capacidade de componentes séricos atuarem na destruição de bactérias, uma vez que a via alternativa do sistema complemento é ativada por componentes de parede de bactérias, contribuindo para sua destruição juntamente com as demais proteínas séricas (Bradley, 1979). Resultados semelhantes foram observados por Kajita et al. (1990) e Mulero et al. (1998) em *Oncorhynchus mykiss* e *Sparus auratus* L., respectivamente. Os autores amostraram os peixes aos 15, 28, 42 e 56 dias, e observaram resposta do imunoestimulante a partir do 15º dia, sendo que os melhores resultados foram apresentados após 28 e 42 dias de administração. O tempo de administração utilizado foi, aparentemente, insuficiente para a expressão do efeito do imunoestimulante na tilápia.

Figura 9. Atividade bactericida do soro de tilápias (média) alimentados com β -glucano. teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: valores são médias seguidas do erros padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

6 CONCLUSÃO

Com base no presente trabalho, pode-se concluir que a inclusão de 0,1% de β -glucano por 15 dias teve influência nas variáveis analisadas do sistema imunológico (sistema imune inato) de tilápias. Entretanto, não causou alterações nas variáveis hematológicas em ambos os tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHMAN, A.H. **Basic Immunology**: functions and disorders of the immune system. [S.l.: s.n.], 2004.
- ABU-ELALA, N.M.; YOUNIS, N.A.; ABUBAKR, H.O.; RAGAA, N.M.; BORGES, L.L.; BONATO, M.A. 2018. Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44: 333–341.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, Amsterdam, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ANGULO, F.J., NARGUND, V.N., AND CHILLER, T.C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Medicine and Veterinary*. v.51, p.374–379. 2004.
- BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of fish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Haworth Press, 2001. p.213-225.
- BARTON, B.A & IWANA, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 10, 03-26.
- BAYNE CJ AND GERWICK L. 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev Comp Immunol* 25: 725-743.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β -glucan. *Brazilian Journal of Biology*, v. 74, n. 3, 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.
- BRETT, J. R. 1958. Implications and assessment of environmental stress. In: LARKIN, P. A. (Ed.). **The investigation of fish-power problems**. Vancouver: MacMillan Lectures in Fisheries, p. 69-83.
- BUENO, S. G. O.; BARRETO, F. M.; REYES, F. G. R.; HISANO, H. Lixiviação De Ração Medicada Com Florfenicol Para Tilápia. 11 Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica. Campinas, 2017.

Chagas, EC, Majolo, C, Boijink, CL, Chaves, FCM, Hashimoto, GSO, Figueredo, AB, Martins, ML. (2014). Uso de óleos essenciais e extratos no tratamento de enfermidades de peixes. In: Maldini RR, Campos CM, Lizama MAP, Takemoto RM, responsabilidade intelectual. Patologia e sanidade de ambientes aquáticos. Maringá: Editora Massoni, p.269.

Chakraborty SB, Hancz C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and anti-stress agents in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3:103-119.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 61 – 434, Maio 2010.

DALMO, R.A.; BOGWALD, J- β -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.384-396, 2008. DOI: j.fsi. 2008.04.008.

Ellis, AE. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25:827-839.

ELLSAESSER, C. F.; CLEM, L. W. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 511-521, 1986.

Engstad, R. E. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* 1993, v. 17, n. 4, p. 319-330.

ESPELID, S.; LOKKEN, G. B.; STEIRO, K.; BOGWALD, J. Effects of cortisol and stress on immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 6, p.

FALCON, D.R. **Nível de suplementação de 1,3 β -glucano e vitamina C em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos.** 2007. 146p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Fast, MD, Sims, DE, Burks, JF, Mustafa, A, Ross, NW. (2002). Skin morphology and humoral non-specific defense parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132 (Part A):645-657.

Fazlollahzadeh, F, Keramati, K, Nazifi, S, Shirian, S, Seifi, S. (2011). Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Hematological Parameters and Plasma Activities of ALT and AST of Rainbow trout in Temperature Stress. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9); 84-90.

FERNANDES, M. O.; VOLPATO, G. L. Estresse social e crescimento de peixes. In:

Congresso de Etiologia, 11. 1993. Bauru. **Anais...** Bauru, São Paulo, 1993. p. 29-141.

Fernandez, A.B., Blas, I., e Ruiz, I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista Aquatic* 18: 33-38.

FERNANDEZ, F.; HINTON, M.; GILS, B. V. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathology* 2002, v. 31, n. 1, p. 49-58.

FIGUEIREDO, H.C.P.; NOBREGA NETTO, L.; LEAL, C.A.G.; PEREIRA, U.P.; MIAN, G. F. *Streptococcus* iniae outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 576-580, 2012.

Fisiopatológicos em Juvenis de tilápia do Nilo: Nível de Suplementação e Tempo de Administração. 2007. 158 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, SP. 2007.

FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia Aquaculture in the Americas, 252-264. In: B.A. Costa Pierce and J.E. Rakocy (Eds.). *Tilapia Aquaculture in Americas*. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, United States. v. 2, 264 p, 2000.

FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia aquaculture in the Americas. In B.A. Costa Pierce and J.E. Rackocy, (eds). **Tilapia Aquaculture in the Americas**, Baton Rouge, LA, USA, The World Aquaculture Society. 2000. v.2, p.252-264.

GALLI, L.F & TORLONI, C.E. 1986. Criação de Tilápias. In: Criação de Peixes. São Paulo, Nobel, 3.ed., 74-85.
GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 35p.

GONÇALVES, E. 1993 *Estratégias territoriais e reprodutivas da tilápia-do-nilo (Oreochromis niloticus)*. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Zoologia pelo Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, São Paulo.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. *Aquaculture Research* 2010; v. 41, n. 6, p. 884-892.

Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M-S. Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhance the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, *Epinephelus bruneus* Against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunol.* 2011;30(1): 128-34.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, MS. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317:1-15.

HINE, P.M. The granulocytes of fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.2, p.79-88. 1992.

JATOBA, A.; VIEIRA, F. D.; BUGLIONE NETO, C. ; SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P.; JERONIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, p. 1201-1207, 2008.

JATOBA, Adolfo et al. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture 0% 25% 50% 75% 100% 0 2 4 6 8 Log(x+1).g of intestine-1 system with marine shrimp. **Fish physiology and biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 725- 732, 2011.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, v. 154, p. 1-15, 1997.

JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast B-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. **Developmental & Comparative Immunology**, Oxford, v. 19, p. 43-57, 1995.

JORY D.E.; ALCESTE C.; CABRERA, T.R. 2000. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte América. *Panorama Acuicola*, Sonora, 5(5), 50-53.

KEBUS, M.J.; COLLINS, M.T.; BROWNFIELD, M.S.; AMUNDSON, C.H.; KAYES, T.B.; MALISON, J.A. Effects of rearing density on stress response and growth of rainbow trout. **Journal of Aquatic Animal Health**. v.4, p.1-6, 1992.

KUMARI, J.; SAHOO, P. K. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. *Aquaculture* 2006, v. 255, n. 1, p. 133-141.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary b-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). **Journal of Fish Diseases**. v.29, p.95– 101, 2006.

Lauridsen, J. e Buchmann, K. 2010. Effects of short and long term glucan feeding of rainbow trout (*salmonidae*) on the susceptibility to *Ichthyophthirius multifiliis* infections. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 40: 61–66.

LIVELY, C.M.; CRADDOCK, C.; VRIJENHOEK, R.C. 1990. Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish. *Letters to Nature*. *Nature*. 344. 864:866.

The comparisons in
protective mechanisms and efficiencies among dietary A-lipoic acid, β -glucan and
l-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*.
Fish and Shellfish Immunology, 86: 785–793.

Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunol.*
MAGNADÓTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Marine
Biotechnology (NY)**, v. 12, n. 4, p. 361-379, 2010. Innate immunity of fish
(overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137- 151, 2006.

MANNING, M. J. Fishes. In: TURNER, R. J. (Ed.). **Immunology**. Chichester:
John Wiley and Sons, p.69-100. 1994.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr.,
J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B.
Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus*
(Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de
estresse de captura. B. Inst. Pesca, São Paulo, n. 3, v. 1, p. 71-80, 2004.
MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. 1977.
Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general
review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106, 201-212.

Menezes, G.C; Tavares-Dias, M.; Ono, E.A.; Andrade, J.I.A; Brasil, E.M.;
Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2006. The
influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response
of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture,
Comparative Biochemistry Physiology. 145(2): 274-279.

Mouriño, JIP, Jatobá, A, Silva, BC, Vieira, FN, Martins, ML. (2012). Probióticos
na aquicultura. In: Silva-Souza AT, Lizama MAP, Takemoto RM,
responsabilidade intelectual. Patologia e sanidade de organismos aquáticos.
Maringá: Editora Massoni, p.381.

NAKAO, M.; TSUJIKURA, M.; ICHIKI, S.; VO, T.K.; SOMAMOTO, T. The
complement system in teleost fish: Progresso f
post-homolog-hunting researches.
Developmental and Comparative Immunology, Elmsford, v. 35, n. 12, p.
1296-1308, 2011.

NOGUEIRA, J.A. Aspectos da biologia reprodutiva e padrões de crescimento
da tilápia *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758, (Linhagem Chitralada) em
cultivos experimentais. 2003. 76 f. Dissertação (Curso de Mestrado em
Recursos Pesqueiros e Aquicultura) Departamento de Pesca, Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2003.

OLIVEIRA, M.C.; CANCHERINI, L.C.; GRAVENA, R.A.; RIZZO, P.V.R.;
MORAES, V.M.B. Utilização de nutrientes de dietas contendo

mananoligossacarídeo e/ou complexo enzimático para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, n.4, p.825-831, 2007.

PAULSEN, S.M.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v.11, p.23-37, 2001.

PEIXE BR. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2021. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura. 12 p. 2021.

PEIXE BR. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2021. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura. 14 p. 2021.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. **Fish Ecophysiology**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 231-264.

PETIT, J.; WIEGERTJES, G. F. Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 64, p. 93-102, 2016.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSI, D. M. et al. Nutrição de peixes. In: CYRINI, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M. et al. (Eds) Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Campo Belo: Tecart, 2004. p. 75-170.

POPMA, T.J. & LOVSHIN, L. L. 1995. Worldwide Prospects for Commercial Production of Tilapia. *International Center for Aquaculture and Aquatic Environments Department of Fisheries and Allied Aquacultures*, Auburn University, Alabama, 36849.

RAILO, E.; NIKINMAA, M., SOIVO, A. 1985. Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 26, 725-732.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., S. B. PÁDUA, M. TAVA-RES-DIAS, M. I. EGAMI: **Métodos para análise hematológica em peixes**. EDUEM, Brazil, 135pp. 2013.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, E. A. T. **Hematologia de peixes brasileiros**. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. S.; LIZAMA, M. A. P. (Ed.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Editora Varela, 2004. cap. 4, p. 89-120.

ROBERTSEN, B.; RØRSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of non specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, n. 5, p. 391-400, 1990.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish & Shellfish Immunology* 2002, v. 12, n. 1, p. 1-16.

Saita, MV. (2010). Parâmetros produtivos, fisiológicos e imunológicos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos à restrição alimentar e estresse de manejo. [Dissertação]. Jaboticabal: UNESP.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1, p. 63-92, 1999. *Science* 2000; v. 79, n. 2, p. 205-211. TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. D.; MARTINS, M. L.; SANTANA, A. E. (2002). Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with gill chytrid phthiriasis and saprolegniosis. *Bol. Inst. Pesca* 2002, v. 28, n. 1, p. 1-9.

SEALEY, W.M.; BARROWS, F.T.; HANG, A.; JOHANSEN, K.A.; OVERTURF, K.; LAPATRA, S.E.; HARDY, R.W. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of β -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 141, p. 115-128, 2008. DOI: j.anifoodsci.2007.05.022.

Selvaraj, V, Sampath, K, Sekar, V. (2015). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 19:293-306.

Shakya SR, Labh SN. (2014). Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2 (4): 44-47.

SHELTON, W. L. Monosex tilapia production through androgenesis. In: MCELWEE, K.; LEWIS, K.; NIDFFER, M.; BUITRAGO, P. (eds). Nineteenth Annual Technical Report. *Pond Dynamics/Aquaculture CRSP*, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 2002, p. 1-9.

SHOEMAKER, C.A.; KLESIOUS, P.H.; PLUMB, J.A. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 58, p. 181-190, 1997.

Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., e Martins, M.L., 2012. Haemorrhagic septicemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 43: 908-916.

SMITH, L. S. **Introduction of Fish Physiology**. Los Angeles: T. H. F. Publications Incorporation, 1982. 353 p.

SOUZA ADL. 2010. Mananoligossacarídeo e β -glucano na suplementação dietária para juvenis de tilápia do Nilo mantidos em tanques-rede. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Stier H, Ebbeskotte V, Gruenwald J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3 / 1,6-D-glucan. Nutr J. 2014;13 (1):38.

Subramanian, S, MacKinnon, SL, Ross, NW. (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology, 148:256-263.

SWAIN, P.; SAHOO, P. K.; AYYAPPAN, S. **Fish and shellfish immunology: an introduction**. Delhi, India: Narendra Publishing House, p. 296, 2006.

Talpur, AD, Ikhwanuddin, M. (2012). Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haematological and immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lateolabrax niloticus* (Bloch). Aquaculture, 364-365: 6-12.

TAVARES-DIAS M., MORAES F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto, São Paulo: Villimpress, v.1, 144 p.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B. de; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S. de. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN NETO, A.; MARIANO, W. dos S.; SÓRIA, S.F.P. (Ed.). **Tópicos especiais em saúde e criação animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009. p.43-80.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características Hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n.1 p.107-114, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144 p.

TAVARES-DIAS, M; DAMATTA, R.A.; RIBEIRO, M.L.S.; CARVALHO, T.M.U.; NASCIMENTO, J.L.M. **Caracterização Morfológica e Funcional de Leucócitos de Peixes**. Embrapa Macapá/AP. 2009.

TIZARD, I. - **Imunologia veterinária - uma introdução**. 6ª ed. São Paulo: Roca, 2002, 608p.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; BENÍTEZ-SANTANA, T.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

fedmannan oligosaccharides (MOS). *Fish & Shellfish Immunology* 2011, v. 30, n. 2, p. 674- 681.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; IZQUIERDO, M. S. Immunostimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannanoligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology* 2007, v. 23, n. 5, p. 969-981.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; IZQUIERDO, M. S. Immunostimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannanoligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 23, n. 5, p. 969-981, 2007.

TORT, L.; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2003.

TRAVER, D.; HERBOMEL, P.; PATTON, E. E.; MURPHEY, R. D.; YODER, J. A.; LITMAN, G. W.; CATIC, A.; AMEMIYA, C. T.; ZON, L. I.; TREDE, N. S. The Zebrafish as a model organism to study development of the immune system. ***Advances in Immunology***, v. 81, p. 254-330, 2003.

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

VALLEJO, A. N.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. ***Annual Review of Fish Disease***, v.2, p.73-89, 1992.

Vaseeharan, B, Thaya, R. (2013). Medicinal plant derivatives as immunostimulantes: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, 22(3):1079–1091.

WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M. FITZSMONNS, K.; HANLEY, F. Tilapia production systems in the Américas: technological advances, trends, and challenges. *Review of Fisheries Science*. v.10, p.465-498, 2002.

WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIOUS, P. H. Immune response and resistance to stress and Edwardsiella ictaluri challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. *Journal of the world Aquaculture Society* 2007, v. 38, n. 1, p. 24-35.

WHITTINGTON, R., LIM, C., KLESIOUS, P.H. 2005. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus* in alevins in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 248, 217–225.

YADA, T. e NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune system in fish. **Int. Rev. Cytol.** p. 35-92., 2002.

ZANIBONI FILHO, E. 2004. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In: Poli C.R.; Poli A.T.B.; Andreatta, E.; Beltrame, E. (Editores) *Aqüicultura: Experiência Brasileira*. Multitarefa, Florianópolis, 309-336.

ZHUA, M.; WUA, S. 2018 The growth performance and non-specific immunity of loach *Paramisgurnus dabryanus* as affected by dietary β -1,3-glucan. *Fish and Shellfish Immunology*, 83: 368-372.