

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/11/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ESTRESSE, IMUNIDADE, SISTEMA
ANTIOXIDANTE E METABOLISMO EM PEIXES
EM CONDIÇÕES SIMULADAS COMUNS DA
CRIAÇÃO**

Mariana Maluli Marinho de Mello

Jaboticabal, São Paulo

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ESTRESSE, IMUNIDADE, SISTEMA
ANTIOXIDANTE E METABOLISMO EM PEIXES
EM CONDIÇÕES SIMULADAS COMUNS DA
CRIAÇÃO**

Mariana Maluli Marinho de Mello

Orientadora: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo

2020

M527e Mello, Mariana Maluli Marinho de
Estresse, imunidade, sistema antioxidante e metabolismo em peixes em condições comuns da criação / Mariana Maluli Marinho de Mello. – – Jaboticabal, 2021
ix, 170 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2020

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Fabiana Garcia Scaloppi, Janessa Sampai de Abreu Ribeiro, Jaqueline Dalbello Biller, Rafael Stevan Sabioni
Bibliografia

1. Estresse crônico. 2. Estresse agudo. 3. Pacu. 4. Salmão. 5. Inoculação. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.3.05

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

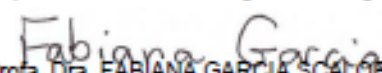
Título: ESTRESSE, IMUNIDADE, SISTEMA ANTIOXIDANTE E METABOLISMO EM PEIXES EM CONDIÇÕES SIMULADAS COMUNS DA CRIAÇÃO.

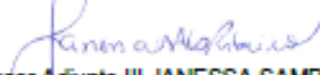
AUTORA: MARIANA MALULI MARINHO DE MELLO

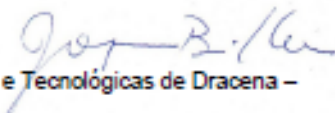
ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP – Jaboticabal


Profa. Dra. FABIANA GARCIA SCALOPPI (Participação Virtual)
Instituto de Pesca de São José do Rio Preto / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios-APTA


Professor Adjunto III JANESSA SAMPAIO DE ABREU RIBEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia e Extensão Rural / UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Virtual) 
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena – UNESP


Prof. Dr. RAFAEL ESTEVAN SABIONI (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba

Jaboticabal, 26 de Novembro de 2020.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar.*

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

*À nova vida que recebemos em nossa família, que enche
nossos corações de amor, meu futuro sobrinho e
afilhado, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati pela orientação, confiança, oportunidades de crescimento e todos os ensinamentos. Muito obrigada pelo carinho, paciência e dedicação, Beth, te admiro muito!

Ao prof. Dr. Anthony Kurt Gamperl pela recepção na Memorial University of Newfoundland, orientação e atenção durante todo o período de Doutorado Sanduíche.

Ao meu pai, por todo companheirismo, colo e carinho. Você sempre foi o meu maior admirador, pai! Não tem ideia da falta que você me faz todos os dias, te amo eternamente!

À minha mãe e irmã que acompanharam cada etapa deste trabalho, minhas angústias, satisfações, desesperos e alegrias. Mesmo longe, estamos sempre perto. Obrigada por estarem sempre comigo, por toda a sinceridade, amizade e amor. A partir do ano que vem seremos quatro novamente e não vejo a hora de viver esta nova etapa da nossa família! Amo demais vocês!

Ao Romulo, meu companheiro de vida. Cada momento fica especial ao seu lado, meu nego!

Aos meus filhos de quatro patas, Gudi, Bolinha e Peteca. Vocês tornam meus dias mais alegres e a personalidade de cada um me surpreende e me encanta! Ter vocês por perto é o que me traz paz.

A todos da minha família, avós, tios e primos por toda torcida e momentos de descontração. Tia Van e Min, vocês são especiais!

Às prof^a. Dr^a. Jaqueline Dalbello Biller e Fabiana Garcia pelas valiosas contribuições e questionamentos durante o exame geral de qualificação.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) pelo fornecimento dos pacus utilizados no experimento.

Ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos pelo fornecimento da bactéria *Aeromonas hydrophila* utilizada no experimento.

Ao prof. Javier Santander pelo fornecimento da bactéria *Aeromonas salmonicida* utilizada no experimento.

À Jeniffer Hall pela paciência e ensinamentos nas análises de expressão gênica.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

À Biorigin pelo fornecimento do β -glucano.

À Damares Perecim Rovieiro pela ajuda nas coletas e fora delas. Adoro conversar com você, Dá, nossa amizade é para a vida toda!

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da Unesp, principalmente ao Valdecir e Márcio pela ajuda no transporte e em várias outras etapas do experimento.

A todos amigos do laboratório de Fisiologia de Peixes: Talísia, Larissa, Rudney, Adriane, Camila, Eduardo, Allan, Thaís Daltoso, Áurea, Raíssa, Allana, Renan, Thaís Lucato e Beatriz pela ajuda nas longas horas de análises e coletas e pelo apoio durante este trabalho e amizade construída.

Ao Fábio e a Ellen por terem me recebido como amigos, irmãos, pais e orientadores no Canadá. Obrigada por todo carinho, atenção, cuidado e preocupação comigo, serei eternamente grata! Adoro demais vocês e não vejo a hora de reencontrá-los e conhecer a Eloise.

Ao Rafael, Ana Maria e Umbertinho pelo carinho e amizade que se fortaleceu. Estar com vocês faz eu me sentir em família!

À Jeneli e Evandro, Juliana e Fernando, Josélia e Joe e Matheus, pelo companheirismo, apoio e amizade, especialmente durante minha permanência no Canadá. A comunidade brasileira no exterior arrasa!

À Rebeccah e Robin por toda ajuda e paciência comigo, tornando meu aprendizado muito mais fácil e prazeroso.

Aos colegas do Ocean Science Centre: Ignácio, Eduardo, Robin, Nigel, Hooba, Setu, Anne, Alicia, Lucie, Mohamed, Charlotte, Kalil, My, Xi, Ruman e Catarina por me recepcionarem tão bem em um momento em que tudo era novidade para mim.

Às sobradas: Jú, Kit, Clara, Tchu e Tami pela amizade eterna. Nós formamos uma família e todos enxergam isso. Amo vocês!

Ao Renato e Moçoila, pela amizade, companhia, discussões, diversão e todas contribuições no trabalho. Nossa amizade é para a vida!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

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

CAPES, Bolsa de Doutorado, Processo nº 88882.433865/2019-01.

CAPES, Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE),
Processo nº88881.189855/2018-01.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	iii
Apoio Financeiro.....	v
Resumo.....	01
Abstract.....	03
Capítulo 1 – Introdução Geral.....	04
1. Panorama da aquicultura.....	05
2. Agentes estressores na aquicultura.....	05
2.1. Perseguição.....	06
2.2. Transporte.....	07
2.3. Hipóxia.....	08
2.4. Temperatura da água.....	09
3. Estresse em peixes.....	10
3.1. Resposta ao estresse agudo.....	11
3.2. Resposta ao estresse crônico.....	14
4. Sistema imune de peixes.....	15
4.1. Sistema imune inato.....	16
4.2. Sistema imune adaptativo.....	21
5. Estresse oxidativo.....	23
6. Sistema antioxidante em peixes.....	24
7. Imunoestimulantes	26
7.1. β -glucano.....	27
8. Gênero <i>Aeromonas</i>	29
9. Modelos biológicos	30
9.1. Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	30
9.2. Salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>).....	31
10. Referências.....	32
Capítulo 2 – Effects of β -glucan on stress, innate immune and antioxidant response of pacu injected with heat-killed <i>Aeromonas hydrophila</i> under different stress conditions.....	52
Abstract.....	53
1. Introduction.....	54
2. Material and Methods.....	55
2.1. Animals and experimental design.....	56
2.2. Experimental diet.....	57
2.3. Bacteria preparation and inoculation.....	57
2.4. Samplings.....	58
2.5. Stress indicators.....	58
2.6. Immunological indicators.....	58
2.7. Antioxidant system	58
2.8. Statistical analysis.....	59

3. Results.....	60
3.1. Stress response.....	60
3.1.1. Plasma cortisol concentrations.....	60
3.1.2. Plasma glucose concentrations.....	61
3.2. Innate immune response.....	63
3.2.1. Respiratory activity of leucocytes (RAL).....	63
3.2.2. Serum hemolytic activity of the complement system (HA-AP).....	65
3.2.3. Serum lysozyme concentration.....	67
3.3. Antioxidant system.....	68
3.3.1. Lipid peroxidation (LPO)	68
3.3.2. Superoxide dismutase activity (SOD).....	70
3.3.3. Catalase activity (CAT).....	71
3.3.4. Glutathione peroxidase activity (GPx).....	72
3.3.5. Glutathione-S-transferase concentration (GST).....	74
3.3.6. Reduced glutathione concentration (GSH).....	75
3.5. Spleen somatic index (SSI).....	76
3.6. Hepato somatic index (HSI).....	78
4. Discussion.....	79
5. Conclusion.....	83
6. Acknowledgements.....	83
7. References.....	83

Capítulo 3 – Chronic hypoxia effects immune responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) injected with formalin-killed *Aeromonas salmonicida* 91

Abstract.....	92
1. Introduction.....	93
2. Material and Methods.....	94
2.1. Animals and experimental design.....	94
2.2. Bacteria preparation and inoculation.....	95
2.3. Samplings.....	95
2.4. Assays.....	96
2.4.1. Innate immune indicators	96
2.4.1.1. Respiratory activity of leucocytes	96
2.4.1.2. Hemolytic activity of the alternative pathway of complement system.....	96
2.4.1.3. Lysozyme concentration.....	97
2.4.2. Cellular blood counting.....	97
2.4.3. Gene expression.....	97
2.4.4. IgM assay.....	100
2.5. Statistical analysis.....	102
3. Results.....	102
3.1. Innate immune response.....	103
3.2. Cellular blood counting.....	105
3.3. Gene expression.....	107
3.4. Adaptive immune response.....	109
4. Discussion.....	109
5. Conclusion	114
6. References.....	114

Capítulo 4 – Chronic hypoxia effects on metabolism and stress responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) 119

Abstract.....	120
1. Introduction.....	121
2. Material and Methods.....	122
2.1. Animals and experimental design.....	122
2.2. Samplings.....	123
2.3. Assays.....	124
2.3.1. Weigth gain	124
2.3.2. Specific growth rate	124
2.3.3. Plasma cortisol concentration	124
2.3.4. Plasma lactate concentration	124
2.3.5. Gene expression.	124
2.3.5. Antioxidant enzymes	128
2.4. Statistical analysis.....	128
3. Results.....	129
3.1. Stress response.....	129
3.2. Gene expression	129
3.3. Antioxidant response	130
3.4. Growth performance	131
4. Discussion.....	132
5. Conclusion.....	135
6. Acknowledge	135
7. References.....	135

Capítulo 5 – Glucan effects on stress, innate immune system and antioxidant enzymes responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) injected with LPS after thermal challenge 141

Abstract.....	142
1. Introduction.....	143
2. Material and Methods.....	144
2.1. Animals and experimental design.....	144
2.2. Experimental diet.....	145
2.3. LPS preparation.....	145
2.4. Samplings.....	145
2.5. Stress indicators.....	146
2.5.1. Plasma cortisol and glucose concentrations.....	146
2.6. Immunological indicators.....	146
2.6.1. Respiratory activity of leucocytes (RAL).....	146
2.6.2. Serum hemolytic activity of the complement system (HA-AP).....	146
2.6.3. Serum lysozyme concentration.....	147
2.7. Antioxidant system and oxidative stress indicators.....	147
2.7.1. Superoxide dismutase activity (SOD).....	147
2.7.2. Catalase activity (CAT).....	147
2.7.3. Glutathione peroxidase activity (GSH-Px).....	148
2.7.4. Glutathione-S-transferase (GST).....	148
2.7.5. Reduced glutathione concentration (GSH).....	148
2.7.6. Lipid peroxidation (LPO).....	148

2.8. Statistical analysis.....	149
3. Results.....	149
3.1. Stress response.....	149
3.1.1. Plasma cortisol concentration.....	149
3.1.2. Plasma glucose concentration.....	150
3.2. Innate immune response.....	150
3.2.1. Respiratory activity of leucocytes (RAL).....	150
3.2.2. Serum hemolytic activity of the complement system (HA-AP).....	151
3.2.3. Serum lysozyme concentration.....	151
3.2.4. Spleen somatic index (SSI)	152
3.3. Antioxidant system.....	153
3.3.1. Superoxide dismutase activity (SOD).....	153
3.3.2. Catalase activity (CAT).....	154
3.3.3. Glutathione peroxidase activity (GSH-Px).....	154
3.3.4. Glutathione-S-transferase (GST).....	155
3.3.5. Reduced glutathione concentration (GSH).....	156
3.3.6. Lipid peroxidation (LPO).....	156
3.3.7. Hepatosomatic index (HSI).....	157
4. Discussion.....	158
5. Conclusion.....	163
6. Acknowledge.....	163
7. References.....	163

RESUMO

Muitas situações inerentes da piscicultura intensiva desencadeiam resposta de estresse nos animais, podendo causar perdas na produtividade. Manejos como a perseguição e o transporte e alterações na qualidade de água como baixos níveis de oxigênio dissolvido (OD) e mudanças na temperatura são exemplos de condições estressantes para os peixes. O conhecimento do impacto dessas condições na fisiologia dos peixes é importante para antever respostas e melhorar a saúde e bem-estar dos peixes, evitando, em consequência, perdas na produção. O uso de imunoestimulantes, como o β -glucano, na aquicultura, é uma alternativa para minimizar os efeitos negativos do estresse, incluindo prejuízos no sistema imune. Além disso, tanto as respostas metabólicas do estresse quanto as respostas do sistema imune são energeticamente caras e podem ter efeito no sistema de produção de energia e balanço redox intracelular. Neste contexto, esta tese é composta por três experimentos que objetivaram avaliar o efeito de situações estressantes na resposta de estresse, metabólica, imune e antioxidante de peixes imunoestimulados ou não com β -glucano. No primeiro experimento, juvenis de pacu, alimentados com β -glucano, foram submetidos à estresse crônico (perseguição) ou/e agudo (transporte), e inoculação com *Aeromonas hydrophila* inativada pelo calor. No segundo experimento, que originou dois capítulos desta tese, salmões foram mantidos por seis semanas em hipóxia (40% OD) e posteriormente foram inoculados com *Aeromonas salmonicida* inativada com formalina. No terceiro experimento, pacus foram alimentados com β -glucano e passaram por um desafio térmico, com queda severa na temperatura da água antes da inoculação com lipopolissacarídeo (LPS). Todos os estressores utilizados neste estudo desencadearam uma resposta de estresse nos peixes, prejudicando a resposta imune, antioxidante e metabólica. Enquanto os estressores agudos (transporte e estresse térmico) provocaram aumento na concentração plasmática de cortisol e/ou glicose, os estressores crônicos (perseguição e hipóxia) fadigaram a responsividade do eixo HPI. A imunoestimulação, seja por LPS ou por bactéria potencializou os efeitos negativos dos estressores, especialmente na resposta antioxidante. O β -glucano apresentou efeito protetor, diminuindo picos na

concentração plasmática de cortisol e evitando a redução na atividade do sistema antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE:

Estresse crônico, estresse agudo, pacu, salmão, inoculação.

ABSTRACT

Many inherent situations in intensive fish farming trigger stress response on animals, which can cause productivity losses. Chase, transport and changes in water quality, as low dissolved oxygen (DO) levels and alterations in water temperature are examples of stressful conditions for fish. Understanding the impact of stressful situations on fish physiology is important to predict responses and improving fish health and well-being, preventing production losses. The use of immunostimulants, as β -glucan, in aquaculture, is an alternative to minimize the negative impacts of stress, including those in immune system. In addition, both metabolic and immune system responses are of high energy cost, and can affect the cellular system of energy production and the intracellular redox balance. In this context, this thesis is composed of three experiments that aimed to evaluate the effects of stressful situations on the stress, immune, metabolic and antioxidant response of non-immunestimulated or glucan-immunestimulated fish. In the first experiment, pacu juveniles fed with β -glucan were subjected to chronic (chase) or/and acute (transport) stress and heat-killed *Aeromonas hydrophila*. In the second experiment, present in two chapters of this thesis, salmon were kept in hypoxia (40% DO) for six weeks before injection with formalin-killed *Aeromonas salmonicida*. In the third experiment, pacu fed with β -glucan were thermal challenged, with severe reduction in water temperature prior lipopolysaccharide (LPS) inoculation. All stressors applied in this study triggered a stress response in fish, impairing the immune, antioxidant and metabolic responses. While acute stressors (transport and thermal challenge) increased plasma cortisol and/or glucose concentration, chronic stressors (chase and hypoxia) reduced the responsiveness of HPI axis. Immunostimulation, either by LPS or bacteria, potentiated the negative effects of stressors, especially in the antioxidant response. The glucan showed a protective effect, reducing peaks in plasma cortisol concentrations and avoiding a decrease in antioxidant system activity.

KEY-WORDS:

Chronic stress, acute stress, pacu, salmon, inoculation.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Panorama da Aquicultura

A aquicultura é uma prática de produção conhecida desde os tempos remotos e é considerada, ultimamente, a única alternativa para aumentar o suprimento de pescado para consumo (Jensen *et al.*, 2014), atendendo à crescente demanda por alimentos de alto valor nutricional (Siqueira, 2017; FAO, 2018). Este sistema de criação utiliza-se da intervenção humana para o aumento da produção (Oliveira, 2009) e como consequência, tem sido o setor que mais cresce no mundo (Jensen *et al.*, 2014).

A estimativa de crescimento mundial do setor até 2030 é de 46,3% (Siqueira, 2017; FAO, 2018) e a expansão deve ocorrer principalmente nos países em desenvolvimento (FAO, 2018). Dentre eles, o Brasil se destaca por possuir grande diversidade de peixes com potencial para aquicultura (Nakatani *et al.*, 2001), clima favorável, uma extensa costa oceânica e cerca de 5,5 milhões de hectares de água doce, dos quais são explorados menos de 1% (Bueno *et al.*, 2017). Desta forma, o Brasil é um país promissor, com grande capacidade para contribuir para a manutenção e aumento da produção aquícola mundial.

Esta pressão para a expansão da aquicultura leva à intensificação dos sistemas produtivos, caracterizados pelo adensamento populacional (Val *et al.*, 2004), exposição a alterações na qualidade da água (Jorgensen *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2004) e alta frequência de manejos (Urbinati *et al.*, 2004). Paradoxalmente, estas características do sistema intensivo geram uma situação estressante para o animal e podem resultar em redução na produção devido ao aumento da mortalidade (Urbinati e Carneiro, 2004).

Deste modo, é necessária a geração de conhecimento em prol de uma aquicultura sustentável, que preze pela saúde e bem-estar do animal e que seja competitiva no mercado.

5. Conclusion

Thermal challenge and LPS injection were stressful situations. While the thermal stress affected negatively humoral innate immune system, the LPS injection impaired the antioxidant enzymes activity. Although β -glucan showed no clear immunostimulant effect, this molecule improved oxidative status in pacu thermal stressed and injected with LPS, reducing the lipid peroxidation, and preventing decrease in antioxidant enzymes activity.

6. Acknowledge

The authors thank the Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) for supplying the fish for the experiments.

7. References

- ABRAM, Q.H.; RODRIGUEZ-RAMOS, T.; BOLS, NC.; KATZENBACK, B.A.; DIXON, B. **Effect of suboptimal temperature on the regulation of endogenous antigen presentation in a rainbow trout hypodermal fibroblast cell line.** *Developmental & Comparative Immunology*, v.100, p.103-423, 2019.
- AEBI, H. **Catalase in Vitro.** *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126, 1984.
- ALBORALI, L. **Climatic variations related to fish diseases and production.** *Veterinary Research Communications*, v.30, p.93-97, 2006.
- ALCORN, S.W.; MURRAY, A.L.; PASCHO, R.J. **Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*).** *Fish & Shellfish Immunology*, v.12, n.4, p.303-334, 2002.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. 1995. **Basic haematology and serology for fish health programs**, In: M. Shariff, J.R. Arthur, R.P. Subasinghe (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture II*, Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 185-202.

ÀRNASON, T.; MAGNADOTTIR, B.; BJORNSSON, B.; STEINARSSON, A.; BJORNSSON, B.T. **Effects of salinity and temperature on growth, plasma ions, cortisol and immune parameters of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)**. Aquaculture, v.380-383, p.70-79, 2013.

ARSLAN, G.; SAHIN, T.; HISAR, O.; HISAR, S.A. **Effects of low temperature and starvation on plasma cortisol, triiodothyronine, thyroxine, thyroid-stimulating hormone and prolactin levels of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*)**. Marine Science and Technology Bulletin, v.4, n.2, p.5-9, 2015.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids**. Review of Fish Diseases, v.1, p.3-26, 1991.

BENITEZ-DORTA, V.; CABALLERO, M.J.; BETANCOR, M.B.; MANCHADO, M.; TORT, L.; TORRECILLAS, S.; ZAMORANO, M.J.; IZQUIERDO, M.; MONTERO, D. **Effects of thermal stress on the expression of glucocorticoid receptor complex linked genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): acute and adaptive stress responses**. General and Comparative Endocrinology, v. 252, p. 173-185, 2017.

BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B.M. **Improved method for the determination of blood glutathione**. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v.61, p.882-890, 1963.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. **Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus***. Brazilian Journal of Biology, v.73, p.425-429, 2013.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J.O. **Recent advances on the complement system of teleost fish**. Fish & Shellfish Immunology, v.20, n.2, p.239-262, 2006.

BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.

BROWN, G.D.; GORDON, S. **Immune recognition of fungal beta-glucan**. Cellular Microbiology, v.7, p.471-479, 2005.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. **Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates.** Methods in Molecular Biology, v.108, p.377-387, 1998.

CASTRO, C.; PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; GUERREIRO, I.; PERES, H.; CASTRO-CUNHA, M.; OLIVA-TELES, A. **Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*).** Comparative Biochemistry and Physiology (Part A), v.163, n.3-4, p.372-378, 2012.

COCKREM, J.F.; BAHRY, M.A.; CHOWDHURY, V.S. **Cortisol responses of goldfish (*Carassius auratus*) to air exposure, chasing, and increased water temperature.** General and Comparative Endocrinology, v.270, p.18-25, 2019.

COLLAZOS, M.E.; ORTEGA, E.; BARRIGA, C. **Effect of temperature on the immune system of a cyprinid fish (*Tinca Tinca*, L) - Blood phagocyte function at low-temperature.** Fish & Shellfish Immunology, v.4, p.231-238, 1994.

CROCKETT, E.L. **The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review.** Journal of Comparative Physiology (Part B), v.178, p.795–809, 2008.

DALMO, R.A.; BØGWALD, J. **β -Glucans as conductors of immune symphonies.** Fish and Shellfish Immunology, v.25, p.384-396, 2008.

DEMERS, N.E.; BAYNE, C.J. **The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout.** Developmental & Comparative Immunology, v.21, p.363-373, 1997.

DEXIANG, C.; AINSWORTH, A.J. **Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). II. Adaptation of anterior kidney phagocytes to 10-8°C.** Comparative Biochemistry and Physiology (Part A), v.100, p.913-918, 1991.

DITTMAR, J.; JANSSEN, H.; KUSKE, A.; KURTZ, J.; SCHARSACK, J.P. **Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*).** Journal of Animal Ecology, v.83, p.744–757, 2014.

DONALDSON, M. R., COOKE, S. J., PATTERSON, D. A., & MACDONALD, J. S. **Cold shock and fish.** Journal of Fish Biology, v.73, n.7, p.1491-1530, 2008.

FAO/NACA, 2001. **Manual of Procedures for the Implementation of the Asia Regional Technical Guidelines on Health Management for the Responsible Movement of Live Aquatic Animals.** *FAO Fisheries Technical Paper* Nº 402 (Suppl. 1), Rome. FAO, 106 p.

GUIJARRO, J.A.; CASCALES, D.; GARCÍA-TORRICO, A.I.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, M.; MÉNDEZ, J. **Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria.** *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.700-711, 2015.

GUZMÁN-VILLANUEVA, L.T.; ASCENCIO-VALLE, F.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, M.E.; TOVAR-RAMÍREZ, D. **Effects of dietary β -1,3/1,6-glucan on the antioxidante and digestive enzyme acivities of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) after exposure to lipopolysaccharides.** *Fish Physiology and Biochemistry*, v.40, p.827-837, 2013.

HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.C. **Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat.** *Journal of Nutrition*, v.104, p.580-587, 1974.

HWANG, H.K.; PARK, K.I.; PARK, S.W.; CHOI, M.S.; KIM, E.O.; DO, J.W.; OH, B.S. **Physiological response of juvenile red sea bream *Pagrus major* exposed to low temperature shock.** *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, v.32, n.1, 2012.

JI, L.; SUN, G.; LI, X.; LIU, Y. **Comparative transcriptome analysis reveals the mechanism of β -glucan in protecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from *Aeromonas salmonicida* infection.** *Fish & Shellfish Immunology*, v.98, n.97-99, 2019.

JIANG, J.; YIN, L.; LI, J.Y.; LI, Q.; SHI, D.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, W.D.; WU, P.; ZHAO, Y.; ZHOU, X.Q. **Glutamate attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative damage and mRNA expression changes of tight junction and defensin proteins, inflammatory and apoptosis response signaling molecules in the intestine of fish.** *Fish & Shellfish Immunology*, v.70, p.473-484, 2017.

KAUR, M.; ATIF, F.; ALI, M.; REHMAN, H.; RAISUDDIN, S. **Heat stress-induced alterations of antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* Bloch.** *Journal of Fish Biology*, v.67, p.1653-1665, 2005.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. **Mechanism of the several activities of the glutathione S-transferases.** *Journal of Biology Chemistry*, v.251, p.6183-6188, 1976.

KIM, Y.-S.; FEI, K.; ZHANG Q.-Y. **Effect of β -glucan on activity of antioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp.** Fish and Shellfish Immunology, v.27, p.336-340, 2009.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K.; SWAIN, T.; SAHOO, S.K.; SAHU, A.K.; MOHANTY, B.R. **Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*.** Aquaculture, v.252, n.2-4, p.121-127, 2006.

LARSEN, A.K.; NYMO, I.H.; SØRENSEN, K.K.; SEPPOLA, M.; RØDVEN, R.; BAGÜÉS, M.P.J.; AL DAHOUK, S.; GODFROID, J. **Concomitant Temperature Stress and Immune Activation may Increase Mortality Despite Efficient Clearance of an Intracellular Bacterial Infection in Atlantic Cod.** Frontiers in Microbiology, v.9, 2963, 2018.

LE MORVAN, C.; CLERTON, P.; DESCHAUX, P.; TROUTAUD, D. **Effects of environmental temperature on macrophage activities in carp.** Fish & Shellfish Immunology, v.7, p.209-212, 1997.

MAGNADOTTIR, B.; JONSDOTTIR, H.; HELGASON, S.; BJORNSSON, B.; JORGENSEN, T.O.; PILSTROM, L. **Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I. The effects of environmental temperature.** Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), v.122, p.173-180, 1999.

MAGNADOTTIR, B. **Innate immunity of fish (overview).** Fish and Shellfish Immunology, v.20, p.137-151, 2006.

MALTEZ, L.C.; BARBAS, A.L.; OKAMOTO, M.H.; LOPES, D.L.A.; ROMANO, L.A.; SAMPAIO, L.A.; GARCIA, L. **Secondary stress responses in juvenile Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, throughout and after exposure to sublethal levels of ammonia and nitrite.** Journal of World Aquaculture Society, v.50, p.346-358, 2018.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M.; MORALES, A.E.; SANZ, A. **Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors.** Reviews in Fish Biology and Fisheries, v.15, p.75-88, 2005.

MCCORD, J.E.; FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein).** Journal of Biological Chemistry, v.244, p. 6049-6055, 1969.

MEENA, D.K.; DAS, P.; KUMAR, S.; MANDAL, S.C.; PRUSTY, A.K.; SINGH, S.K.; AKHTAR, M.S.; BEHERA, B.K.; KUMAR, K.; PAL, A.K.; MUKHERJEE, S.C. **Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review)**. Fish Physiology and Biochemistry, v.39, n.3, p.431-457, 2013.

MELLO, M.M.M.; FARIA, C.F.P.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **β -glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with heat-killed *Aeromonas hydrophila***. Fish and Shellfish Immunology, v.93, p.1076-1083, 2019.

MOKHBATLY, A.A.A.; ASSAR, D.H.; GHAZY, E.W.; ELBIALY, Z.; RIZK, S.A.; OMAR, A.A.; GAAFAR, A.Y.; DAWOOD, M.A.O. **The protective role of spirulina and β -glucan in African catfish (*Clarias gariepinus*) against chronic toxicity of chlorpyrifos: hemato-biochemistry, histopathology, and oxidative stress traits**. Environmental Science and Pollution Research, v.27, p.31636-31651, 2020.

NIKOSKELAINEN, S.; BYLUND, G.; ESA-MATTILILIUS. **Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity**. Developmental & Comparative Immunology, v.28, n.6, p.581-592, 2004.

NIMSE, S.B.; PAL, D. **Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms**. RSC Advances, v.5, p.27986-28006, 2015.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. **β -glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action**. Journal of Immunotoxicology, v.5, p.47-57, 2008.

ROMBOUT, J.H.; HUTTENHUIS, H.B.T.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, S. **Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes**. Fish & Shellfish Immunology, v.19, p.441-455, 2005.

RUDNEVA, I.I. **Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleost**. Comparative Biochemistry and Physiology (Part C), v.118, p.255-260, 1997.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. **Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system**. Aquaculture Research, v.39, p.223-239, 2008.

SCHWARZ, K.B. **Oxidative stress during viral infection: a review**. Free Radical Biology & Medicine, v.21, p.641-649, 1996.

SECOMBES, C.J.; WANG, T. 2012. **The innate and adaptive immune system of fish**. In: *Infectious disease in Aquaculture: Prevention and Control*. Austin, B. (Ed.). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 3-68.

SLADJAN, Z.P.; SLAVICA, S.B.M.; TIJANA, B.R.; BRANKA, R.P.; SVETLANA, G.D.; JELENA, P.G.; ZORICA, S.S. **Seasonal variations of the activity of antioxidant defense enzymes in the red mullet (*Mullus barbatus L.*) from the Adriatic Sea**. *Marine Drugs*, v.8, p.413-428, 2010.

SOTO, E.; BROWN, N.; ZACKARIAS, O.G.; YOUNT, S.; REVAN, F.; FRANCIS, S.; KEARNEY, M.T.; CAMUS, A. **Effect of size and temperature at vaccination on immunization and protection conferred by a live attenuated *Francisella noatunensis* immersion vaccine in red hybrid tilapia**. *Fish and Shellfish Immunology*, v.41, p.593-599, 2014.

TAKAHARA, T.; YAMANAKA, H.; SUZUKI, A.A.; HONJO, M.N.; MONAMOTO, T.; YONEKURA, R.; ITAYAMA, T.; KOHMATSU, Y.; ITO, T.; KAEABATA, Z. **Stress response to daily temperature fluctuations in common carp, *Cyprinus carpio L.*** *Hydrobiologia*, v.675, 65, 2011.

TORT, L.; ROVIRA, R.L. **Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures**. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)*, v.120, n.1, p.175-179, 1998.

WENDELAAR BONGA, S.E. **Hormone Response to Stress**. In: FARREL, A.P.; CECHE, J.J.; RICHARDS, J.G.; STEVENS, E.D. (Ed.). *Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment*. Elsevier Academic Press Inc, UK, p.1515-1523, 2011.

ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C.; RISE, M.L.; HALL, J.R.; NASH, G.W.; GAMPERL, A.K. ***Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)**. *Aquaculture*, v.435, p.1-9, 2015.

ZANUZZO, F.S.; SABIONI, R.E.; MONTOYA, L.N.F.; FAVERO, G.; URBINATI, E.C. 2017. ***Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection**. *Fish and Shellfish Immunology*, v.65, p.198-205, 2017.

ZARKADIS, I.K.; MASTELLOS, D.; LAMBRIS, J.D. **Phylogenetic aspects of the complement system**. *Developmental & Comparative Immunology*, v.25, n.8-9, p.745-762, 2001.

ZENG, L.; WANG, Y.; AI, C.; ZHENG, J.; WU, C.; CAI, R. **Effects of β -glucan on ROS production and energy metabolism in yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) under acute hypoxic stress.** Fish Physiology and Biochemistry, v.42, p.1395-1405, 2016.