

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**BETA-GLUCANO INFLUÊNCIA A
SOBREVIVÊNCIA DE TILÁPIA-DO-NILO APÓS
INFECÇÃO POR *Francisella orientalis***

Carlos Humberto Casanova Quispe

Jaboticabal – São Paulo

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**BETA-GLUCANO INFLUÊNCIA A
SOBREVIVÊNCIA DE TILÁPIA-DO-NILO APÓS
INFECÇÃO POR *Francisella orientalis***

Carlos Humberto Casanova Quispe

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo

2022

Q8b Quispe, Carlos Humberto Casanova
Beta-glucano influência a sobrevivência de tilápia-do-Nilo após infecção
por *Francisella orientalis* / Quispe, Carlos Humberto Casanova Quispe. --
Jaboticabal, 2022
40 p. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2022

Orientador: Fabiana Pilarski

Banca examinadora: Raphael Barbeta de Jesus, Pedro Henrique de
Oliveira Viadanna

Bibliografia

1. Aquicultura. 2. *Oreochromis niloticus*. 3. Bactéria. 4.
Imunomoduladores. 5. Peixe Doenças. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de
Aquicultura.

CDU 639.3.09

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

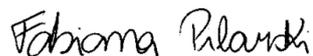
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito da suplementação alimentar com β -glucano na sobrevivência de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* desafiada com *Francisella orientalis*

AUTOR: CARLOS HUMBERTO CASANOVA QUISPE

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

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



Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp, Jaboticabal-SP



Dr. RAPHAEL BARBETTA DE JESUS (Participação Virtual)
Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp, Jaboticabal-SP



Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA VIADANNA (Participação Virtual)
Universidade da Flórida, Flórida-EUA

Jaboticabal, 25 de março de 2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais
Carmen Quispe Hernandez e Carlos Casanova Rondoy

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã por acreditar em mim por me dar apoio, muito amor e carinho ilimitados.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) e a todos os funcionários e prestadores de serviço do setor, por fornecer subsídios para a realização do trabalho.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP, pela ajuda incondicional, e agradeço a minha orientadora Fabiana Pilarski, pela confiança e força que ela fornece aos seus orientados.

Aos meus amigos Jefferson Yunis, Alexander Cueva, Fernando Ramos e Caled Álvarez, que me deram apoio e me incentivaram a fazer o mestrado aqui em Jaboticabal.

APOIO FINANCEIRO

Agradeço Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos que permitiu que eu realizasse esse projeto (132878/2019-4).

SUMÁRIO

1. Introdução	3
2. Revisão de literatura	5
2.1 A tilápia-do-Nilo	5
2.2 Sistema imunológico em peixes	5
2.2.1 Considerações gerais sobre o sistema imunológico em peixes	5
2.2.2 Imunidade inata	8
2.2.3 Imunomodulação e imunoestimulantes	9
2.3 Beta-glucano	10
2.4 <i>Francisella orientalis</i>	13
3. Objetivo	15
4. Material e Métodos	15
4.1 Animais e condições experimentais	15
4.2 Bactéria e condições de crescimento	15
4.3 Delineamento experimental	15
4.4 Preparo da dieta experimental	16
4.5 Análise Estatística	17
5. Resultados	17
5.1 Desafio bacteriano	17
5.2 Sobrevivência após o desafio com a bactéria <i>Francisella orientalis</i>	17
6. Discussão	19
7. Conclusão	20
8. Referências	21

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação alimentar com β -glucano na sobrevivência de tilápia-do-Nilo desafiada com *Francisella orientalis*, um patógeno endêmico de grande importância para a aquicultura brasileira e mundial. Considerando que o uso de β -glucano provoca um incremento na proteção frente a patógenos bacterianos em várias espécies de peixes e também exerce efeitos moduladores no sistema imune inato, 240 juvenis de tilápia-do-Nilo foram suplementados com C: 0%, T1: 0.1% e T2: 0.3% de β -glucano (Macrogard®) e, posteriormente submetidos ao desafio bacteriano com *Francisella orientalis*. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais (1,5% do peso vivo) duas vezes ao dia (9h00 e 17h00), por um período de 30 dias. Duas caixas do grupo C e quatro caixas dos grupos T1 e T2 foram inoculados intracelomicamente com 0,1 mL de uma suspensão bacteriana (determinada em ensaio de DL50%) de *F. orientalis* ($1,95 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹). As outras duas caixas do grupo C foram inoculadas com 0,1 mL de tampão fosfato-salino (PBS). As mudanças no comportamento, os sinais clínicos e a mortalidade diária foram avaliadas durante 15 dias após a infecção. Este estudo demonstrou que a suplementação alimentar com 0,3% de β -glucano proporcionou maior sobrevivência nos peixes após o desafio com *Francisella orientalis* nas condições experimentais testadas.

1. INTRODUÇÃO

A tilápia é a principal espécie de peixe produzida no Brasil. Em 2021, a produção no país foi de 534mil toneladas, o equivalente a 63,5% do total da aquicultura brasileira (PEIXE BR, 2022).

A intensificação na produção de tilápia aumentou consideravelmente o estresse sofrido pelos animais, e com isso, a susceptibilidade a agentes infecciosos. Dentre as bactérias de maior importância para a tilapicultura mundial destacam-se o *Streptococcus agalactiae* (principalmente sorotipo Ib e III), responsável por um número elevado de mortalidade (MIAN *et al.*, 2009; BARONY *et al.*, 2017) e a *Francisella orientalis* (COLQUHOUN e DUODU, 2011; RAMIREZ-PAREDES *et al.*, 2020).

A *Francisella orientalis* é um patógeno emergente de peixes tropicais causador da franciselose. Ocorre principalmente nas fases de alevino e juvenil em tilápia, quando a temperatura da água é menor que 22° C (SOTO *et al.*, 2009). A franciselose pode se apresentar como uma doença aguda com poucos sinais clínicos e altas taxas de mortalidade ou como uma infecção subaguda a crônica com sinais clínicos inespecíficos (SOTO *et al.*, 2009; BIRKBECK *et al.*, 2011; COLQUHOUN e DUODU, 2011). As principais lesões são observadas em órgãos parenquimatosos, onde pode ser observado macro e microscopicamente a presença de granulomas (SOTO *et al.*, 2009).

As principais formas de prevenção de doenças em peixes consistem em técnicas de boas práticas na produção (SCHWARZ *et al.*, 2019), e se destacam também o uso de vacinação (LIU *et al.*, 2016) e a utilização de imunomoduladores na ração (RINGØ *et al.*, 2012). No Brasil há atualmente uma única vacina comercial para tilápias, licenciada contra a estreptococose (Aquavac® STREP Sa) (MSD SAÚDE ANIMAL, 2012), e nenhuma vacina comercial disponível contra a franciselose. Desta forma, uma das formas de prevenção de surtos de franciselose é através do uso de aditivos na dieta para incrementar o sistema imunológico dos peixes (RAGHIANTE *et al.*, 2017).

Os imunomoduladores são substâncias como polissacarídeos, hormônios, vitaminas, componentes celulares, extrato ou óleos essenciais de plantas ou drogas sintéticas (MOHAPATRA *et al.*, 2013; BUCHMANN, 2014; KASAHARA e SUTOH, 2014; SONG

et al., 2014; SHRESTHA *et al.*, 2015) que melhoram o sistema imunológico, pois são reconhecidos pelos componentes do sistema imunológico e iniciam uma resposta celular e humoral semelhante àquela causada por organismos patogênicos (GANNAM e SCHROCK, 1999). Algumas respostas que tem sido reportadas em peixes incluem ativação de macrófagos, aumento da fagocitose por neutrófilos e monócitos, aumento do número de linfócitos, imunoglobulinas, e lisozima séricas (RAA, 1996; SAKAI, 1999). Deste modo, os imunomoduladores podem aumentar a resistência frente a doenças, como já foi observado em salmão do atlântico (*Salmo salar* L.) infectado com *Aeromonas salmonicida* (uso de glucano de levedura) (RØRSTAD *et al.*, 1993), em tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) frente a uma infecção por *Citrobacter freundii* (uso de extrato de *Azadirachta indica*) (THANIGAIVEL *et al.*, 2015) ou em rohu (*Labeo rohita*) infectado com *Aeromonas hydrophila* (uso de vitamina C) (TEWARY e PATRA, 2008). Foi observado, inclusive, que a administração de glucanos na fase embrionária pode aumentar o tamanho larval e a taxa de ganho de peso em tilápia do Nilo (B. DE JESUS *et al.*, 2019) e salmão-keta (KISELEVA *et al.*, 2014), respectivamente.

Dentre os imunomoduladores utilizados na aquicultura, o β -glucano é dos mais empregados e pesquisados (ZHANG *et al.*, 2019; CHING *et al.*, 2020). O β -glucano é um componente polissacarídeo da parede celular de cereais, bactérias e fungos, quando administrado por via oral, aumenta a imunidade inata ao ser detectado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes no intestino dos peixes (BOSCHI *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2016; CHING *et al.*, 2020). Esses receptores, tais como aqueles do tipo *toll* (TLRs), ou lectinas do tipo C (CLRs), estão presentes na membrana das células imunológicas (LOKESH *et al.*, 2012). Os TLRs podem detectar a presença de β -glucano, e desse jeito é estimulada a produção de citocinas pro inflamatórias para modular a resposta imune (JIN *et al.*, 2015). O uso de β -glucano é eficaz para aumentar a resistência frente a doenças causadas por bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Streptococcus* e em tilápia-do-Nilo (DALMO *et al.*, 1997; SAKAI, 1999; DEFOIRDT *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2016; PILARSKI *et al.*, 2017; ALBERS *et al.*, 2021), e pode ser utilizado como uma alternativa frente ao uso de antimicrobianos no tratamento de infecções bacterianas em tilápia de Moçambique (THANIGAIVEL *et al.*, 2015).

Tendo em vista a relevância da franciselose na produção de tilápias, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da dieta suplementada com β -glucano na sobrevivência da

tilápia-do-Nilo após infecção por *Francisella orientalis*, permitindo assim a elaboração de novos protocolos para a prevenção e/ou redução do impacto desse patógeno emergente para a aquicultura mundial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Tilápia-do-Nilo

A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, é um peixe tropical, da família *Cichlidae*, originária da África e introduzida em mais de 90 países ao redor do mundo, se tornando a espécie de produção que mais cresceu nas últimas três décadas (ATTAYDE *et al.*, 2011; ISHIKAWA *et al.*, 2012). A produção mundial de tilápia alcançou os 4,5 milhões de toneladas no ano 2018 (FAO, 2020).

A tilápia apresenta rápida taxa de crescimento, tolera qualidade de água adversa e doenças, fácil adaptação aos diversos tipos de ambientes e sistemas de criação (HASSANIEN *et al.*, 2004; KULAC *et al.*, 2012; QIANG *et al.*, 2014). Além disso, a carne de tilápia é muito apreciada pelo consumidor, com baixo teor de gordura e de calorias, com filé de fácil processamento e rendimento em torno de 35% (TAVARES e PALHARES, 2011; GARCIA *et al.*, 2017; PREMARATHNA *et al.*, 2018).

A produção de tilápia-do-Nilo é amplamente difundida no Brasil, onde em 2021 a produção foi de 534 mil toneladas, o equivalente a 63.5% do total produzido pela aquicultura no país (PEIXE BR, 2022). A criação de tilápia está concentrada nas Regiões Sul e Sudeste, sendo responsáveis por 72,5% do volume nacional (IGBE, 2019). No estado do Paraná, maior produtor brasileiro, o 95,2% da produção aquícola corresponde à criação de tilápia. São Paulo (segundo maior produtor) e Minas Gerais (terceiro maior produtor) contribuíram com 14,1% e 10,5% da produção nacional de tilápia (IGBE, 2019).

2.2 Sistema imunológico dos peixes

2.2.1 Considerações gerais sobre o sistema imunológico dos peixes

O sistema imunológico dos peixes é composto pelos sistemas imune inato e adaptativo (SECOMBES e BELMONTE, 2016). O sistema imune inato atua de maneira inespecífica, evitando a entrada e estabelecimento de agentes patogênicos no organismo (JØRGENSEN, 2014). Já o sistema imune adaptativo é caracterizado por mecanismos baseados no reconhecimento de antígenos específicos prévios, o que facilita uma resposta mais pronunciada e rápida na próxima exposição ao mesmo patógeno (CASTRO e TAFALLA, 2015).

As estruturas, nas quais as células envolvidas na resposta imune são organizadas são chamadas coletivamente de sistema linfoide e são organizadas em órgãos encapsulados ou acúmulos de tecido linfoide difusos (SECOMBES e WANG, 2012). Os órgãos e tecidos linfoides são classificados como primários (centrais) ou secundários (periféricos) em mamíferos (SECOMBES e WANG, 2012). Nos peixes ósseos, os órgãos linfoides incluem o timo, o rim, e o baço, e os tecidos linfoides associados à mucosa (MALT, acrônimo em inglês de *mucosa-associated lymphoid tissue*) incluem o tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*), tecido linfoide associado à pele (SALT, *skin-associated lymphoid tissue*), tecido linfoide associado às brânquias (GIALT, *gill-associated lymphoid tissue*), e o tecido linfoide associado à nasofaringe (NALT, *nasopharynx-associated lymphoid tissue*) (BOEHM e BLEUL, 2007; URIBE *et al.*, 2011; SALINAS *et al.*, 2015).

O timo é considerado um órgão chave do sistema imune, está localizado perto da cavidade branquial e está intimamente associado com o epitélio faríngeo (BJØRGEN e KOPPANG, 2021). A sua estrutura é altamente variável entre espécies e mesmo dentro da mesma espécie de acordo com a idade (SECOMBES e WANG, 2012). O timo é o principal local de proliferação, diferenciação e maturação de linfócitos T e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do sistema imunológico e nas respostas imunes (DOS SANTOS *et al.*, 2000). Em peixes não há diferenciação córtico-medular do timo como pode se observar nos mamíferos (SECOMBES e WANG, 2012).

O rim é um órgão que está localizado ao longo do eixo do corpo, acima da bexiga natatória (SECOMBES e WANG, 2012). A parte imunológica ativa, o rim cefálico, é considerado nos teleósteos equivalente a medula óssea dos mamíferos, e é o maior local de hematopoiese até a idade adulta (ZAPATA, 1976; ZAPATA *et al.*, 2006). Os tipos de

hematopoiese reportados no rim cefálico incluem eritropoiese, granulopoiese, trombopoiese, monopoiese e linfoplasmopoiese (ABDEL-AZIZ *et al.*, 2010). As células linfopoiéticas incluem linfoblastos, linfócitos grandes, linfócitos pequenos e ativos e células plasmáticas inativas (SECOMBES e WANG, 2012). Além disso, o rim é o principal órgão produtor de anticorpos (TIAN *et al.*, 2009).

No baço, os peixes armazenam linfócitos e melanomacrófagos que, dependendo da espécie, podem ser organizados em grupos ou dispersos na polpa branca (AGIUS e ROBERTS, 2003). Uma vez que o sangue flui através do baço, antígenos são mantidos nas junções de macrófagos para serem processados e apresentados aos linfócitos T (PRESS e EVENSEN, 1999; SOLEM e STENVIK, 2006).

Por outro lado, os tecidos linfoides associados ao trato gastrointestinal (GALT), que inclui a mucosa gastrointestinal, podem ser encontrados como aglomerados de células de defesa, incluindo macrófagos, linfócitos, mastócitos e granulócitos. Essas células de defesa secretam juntamente com o muco proveniente das células caliciformes, componentes solúveis como lisozima, proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas, que irão atuar na defesa imunológica contra organismos exógenos a fim de promover a primeira barreira contra microrganismos (GEORGOPOULOU e VERNIER 1986; ROMBOUT *et al.* 2010; BILLER-TAKAHASHI e URBINATI, 2013). A pele dos peixes atua como primeira linha de defesa e contém tecido linfoide associado à pele (SALT), que tem uma resposta semelhante ao GALT frente a infecções (XU *et al.*, 2013). O SALT tem um papel fundamental na defesa contra agentes patogênicos durante o período inicial de desenvolvimento dos peixes teleósteos (YU *et al.*, 2020). A resposta imune do tecido linfoide associado às brânquias (GIALT) é acionada pelos patógenos e contaminantes ambientais presentes na água e tem sido reportada a presença de imunoglobulinas e de plasmócitos (MAKI e DICKERSON., 2003; GÓMEZ *et al.*, 2014). O tecido linfoide associado à nasofaringe (NALT) é semelhante a outros MALT e contém células linfoides difusas e imunoglobulinas (YU *et al.*, 2020).

Por último, o fígado dos peixes tem função imunológica similar a dos mamíferos de produzir compostos humorais, como proteínas do sistema complemento e proteínas de fase aguda da resposta inflamatória (DAVIDSON *et al.*, 1997; SALINAS *et al.*, 2011).

2.2.2 Imunidade inata

Os componentes da imunidade inata em peixes podem ser classificados em barreiras físicas, celulares e humorais (MAGNADOTTIR, 2010). As barreiras físicas incluem as escamas, superfícies mucosas da pele e brânquias e a epiderme (INGRAM, 1980; SHEPHARD, 1994; ELLIS, 2001). Um dos mecanismos de proteção mais importantes da mucosa é a produção de muco, o qual contém moléculas importantes para inibir a entrada de patógenos no organismo (URIBE *et al.*, 2011; SECOMBES e WANG, 2012). As brânquias são formadas pelo epitélio branquial, uma camada de glicocálix e uma de muco, componentes importantes para a produção de células secretoras de anticorpos após imunização por imersão (dos SANTOS *et al.*, 2001). Do mesmo modo, a integridade da epiderme é essencial para manter o equilíbrio osmótico e para evitar a entrada de patógenos (HIBIYA, 1994; CEBALLOS *et al.*, 2018).

Por outro lado, as barreiras humorais incluem lectinas, lisozima, inibidores de proteases, inibidores de crescimento bacteriano, peptídeos antimicrobianos, proteínas do sistema complemento, pentraxinas, precipitinas, imunoglobulinas, aglutininas, citocinas, interferon e quimiocinas (MAGNADOTTIR, 2006). A maioria desses componentes são sintetizados pelo fígado, no entanto, eles também podem ser sintetizados pelo cérebro e pelos leucócitos (BILLER-TAKAHASHI e URBINATI, 2013).

Uma ampla variedade de tipos celulares está envolvida na resposta imune inata dos peixes, incluindo as células fagocíticas como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, além das células citotóxicas não específicas e células *natural killer* (SECOMBES e Wang, 2012; FISCHER *et al.*, 2013). Células epiteliais e células dendríticas teciduais também participam dessa resposta (PRESS *et al.*, 1994; GANASSIN e BOLS, 1996).

As células mencionadas acima respondem a biomoléculas presentes em vários grupos de organismos chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*), os quais são reconhecidos pelo hospedeiro mediante receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, *pattern recognition receptors*), tais como receptores do tipo “toll” (TLRs, *Toll-like receptors*), receptores do tipo lectinas tipo C (CLRs, *C-type lectins*), receptores do tipo RIG (RLRs, *Retinoic acid inducible gene I [RIG-I]-like receptors*), receptores do tipo NOD (NLRs, *Nucleotide binding oligomerization*

domain [NOD]-like receptors) e receptores do tipo AIM (ALRs, *Absent in melanoma [AIM]-like receptors*) (HANSEN *et al.*, 2011).

Outro componente de defesa que desempenha um papel decisivo na resposta imune inata dos peixes são os peptídeos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*) (SMITH *et al.*, 2010). Os AMPs apresentam várias funções além de seus efeitos microbicidas, como imunomodulação, promoção da cicatrização de feridas, indução a produção e atuação de quimiocinas, e recrutamento de células apresentadoras de antígenos (CHAKCHOUK-MTIBAA *et al.*, 2014; NIGGEMANN *et al.*, 2014). Os AMPs caracterizados em teleósteos incluem piscidinas, defensinas, hepcidinas, cathelicidins e peptídeos derivados de histona (SHABIR *et al.*, 2017).

Igualmente, o sistema complemento é um componente principal da defesa inata nos peixes (SECOMBES e WANG, 2012) e envolve cerca de 35 proteínas solúveis e ligadas à membrana (HOLLAND e LAMBRIS, 2002). A função mais conhecida do sistema complemento é a sua capacidade de matar patógenos através da formação do complexo de ataque de membrana (MAC, *membrane attack complex*) para a lise da célula alvo por meio de múltiplos poros na membrana, causando perda do balanço eletrolítico celular, além de outras funções imunológicas efetoras (HOLLAND e LAMBRIS, 2002; NAKAO *et al.*, 2011). O sistema complemento é dividido em três principais vias de ativação: a via clássica, a via alternativa e pela via das lectinas (HOLLAND e LAMBRIS, 2002).

A via clássica é acionada pela ligação de um anticorpo a uma superfície celular. A via alternativa é ativada diretamente por vírus, bactérias, fungos ou mesmo células tumorais e é independente da ligação de um anticorpo a uma superfície celular, e a via das lectinas é iniciada pela união da lectina ligadora de manose (MBL, *Mannose-binding lectin*) a mananos da superfície das células bacterianas (HOLLAND e LAMBRIS, 2002).

2.2.3 Imunomodulação e imunomoduladores

Um imunomodulador é uma substância natural ou sintética que estimula o sistema imunológico por vias específicas (vacinas ou antígenos) ou não específicas (independentemente da especificidade antigênica) (VALLEJOS *et al.*, 2016). A imunomodulação do sistema imune inato consiste na exposição de uma célula a um agonista,

usualmente um PAMP, de maneira que a exposição ao agonista resulte em uma resposta aumentada (treinada) ou suprimida (tolerante) (BYRNE *et al.*, 2020). A maioria dos imunomoduladores são compostos químicos que podem ser elementos estruturais naturais de bactérias (lipopolissacarídeos, lipopeptídeos, glicoproteínas e peptídeos muramil), fungos filamentosos e leveduras (β -glucanos de parede celular e produtos derivados), nucleotídeos, além de alguns compostos sintéticos, como Levamisole, ubenimex (Bestatin), entre outros (RAA, 2000; MEENA *et al.*, 2013).

A redução na utilização de antimicrobianos na aquicultura é recomendado mundialmente, pois o seu uso resulta no acúmulo de vários resíduos prejudiciais nos produtos aquícolas e os seus efeitos colaterais se tornam uma ameaça crescente para os consumidores (RINGØ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016). Assim, os imunomoduladores têm o potencial de se tornarem uma importante alternativa aos antimicrobianos, e podem contribuir para a diminuição ou substituição do seu uso, o que é um objetivo tanto da pesquisa quanto da produção aquícola global (WANG *et al.*, 2016; ABDEL-LATIF *et al.*, 2022).

2.3 Beta-glucano

Os glucanos são polímeros polissacarídeos que podem ser de dois tipos dependendo da base das ligações glicosídicas presentes neles, α -glucanos (dextrano com ligações α -1,6, amidos com ligações α -1,4 e α -1,6) (NAESSENS *et al.*, 2005; MEENA *et al.*, 2013) e β -glucanos (celulose com ligações β -1,4, zymosan com ligações β -1,3, laminarina com ligações β -1,3, e lichenina com ligações β -1,3 e β -1,4) (READ *et al.*, 1996; KROON-BATENBURG e KROON, 1997; CARBONERO *et al.*, 2005; MEENA *et al.*, 2013). Os glucanos podem ser encontrados de forma natural nas bactérias, algas, fungos e plantas, onde eles fazem parte da estrutura da parede celular (ZHANG *et al.*, 2019).

A fonte mais comum de β -glucano é proveniente da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (MEENA *et al.*, 2013). O β -glucano tem sido extensamente utilizado como aditivo alimentar por seus efeitos benéficos à saúde dos animais de produção (ZHANG *et al.*, 2019). Vários estudos demonstraram atividade pro-inflamatória e antifúngica após sua administração e os inúmeros benefícios da suplementação dietética com esse

imunomodulador também tem sido relatada nos organismos aquáticos (VETVICKA *et al.*, 2013; DAWOOD *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019).

A suplementação alimentar com β -glucano em várias espécies de peixes resultou no aumento da resistência a patógenos bacterianos, como *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Edwardsiella tarda* (YOO *et al.*, 2007; SIRIMANAPONG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; UDAYANGANI *et al.*, 2017), parasitários como o protozoário *Neoparamoeba* sp e o microsporídeo *Loma salmonae* (BRIDLE *et al.*, 2005; GUSELLE *et al.*, 2007), e virais, como o vírus da necrose hematopoiética infecciosa (LAPATRA *et al.*, 1998; SEALEY *et al.*, 2007).

Como consequência da melhoria da atuação do sistema imune inato, é observado uma melhora do processo de cicatrização (PRZYBYLSKA-DIAZ *et al.*, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2015) e estimulação de mecanismos de defesa inespecíficos (DALMO e BØGWALD, 2008), tais como aumento na produção de lisozima, da atividade respiratória de leucócitos, da atividade da via alternativa do complemento e incremento na velocidade de resposta dos macrófagos (COOK *et al.*, 2001; SAHOO e MUKHERJEE, 2001; AI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2009). Em adição a esses efeitos imunoestimulantes, os β -glucanos participam também da modulação da microbiota intestinal dos peixes, atuando também como prebiótico (KÜHLWEIN *et al.*, 2013; MIEST *et al.*, 2016; JUNG-SCHROERS *et al.*, 2016). O β -glucano pode enriquecer a microbiota no intestino do peixe para melhorar a imunidade intestinal (CHING *et al.*, 2020), como foi observado em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (JUNG-SCHROERS *et al.*, 2016). As carpas suplementadas com o aditivo mostraram maior diversidade de bactérias intestinais, o que impede a invasão e adesão de bactéria ruins, reduzindo a infecção bacteriana no intestino (JUNG-SCHROERS *et al.*, 2016). O β -glucano pode também aumentar a resposta adaptativa a nível intestinal (CHING *et al.*, 2020), como observado no intestino do salmão do atlântico, com um aumento dos níveis de transcrição de imunoglobulina T após administração oral (KIRON *et al.*, 2016).

Os β -glucanos atuam como PAMPs, os quais são identificados pelos PRRs, tais como os TLRs, ou CLR, os quais estão presentes na membrana das células imunológicas como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos (LOKESH *et al.*, 2012). O TLR2 e TLR4 podem detectar padrões fúngicos como o β -glucano, e podem estimular a produção de citocinas pro inflamatórias, como a interleucina1 β (IL-1 β), o fator de necrose tumoral

(TNF, *tumour necrosis factor*) e a interleucina 8 (IL-8), para modular a resposta imune (JIN et al., 2015). Este processo de reconhecimento pode mediar a via do NF- κ B (fator nuclear kappa B), um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória (SKALNIK, 2002; KANJAN et al., 2017).

O receptor de β -glucano melhor descrito é a Dectina-1, um membro da família das lectinas do tipo C (CLR) (ZELENSKY et al., 2005). A Dectina-1 é o principal receptor de β -glucano nas linhagens celulares de monócitos/macrófagos e neutrófilos (BROWN et al., 2002). A ligação do polissacarídeo com a Dectina-1 depende da presença de triptofano, histidina e tirosina no domínio de reconhecimento de carboidratos, os quais formam um sulco superficial hidrofóbico e podem se ligar com o β -glucano através de interações hidrofóbicas (ADACHI, 2004).

Os β -glucanos podem ativar os fagócitos, estimulando sua atividade fagocítica, citotóxica e antimicrobiana, e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PILARSKI et al., 2017), e podem aumentar a produção de proteínas líticas, como lisozima (AI et al., 2007; CHANG et al., 2013) e proteínas do sistema complemento (PIONNIER et al., 2014).

É necessário utilizar uma dosagem adequada de β -glucano para fornecer um efeito imunomodulador nos peixes (CHING et al., 2020). Assim como a concentração de β -glucano abaixo da ideal pode não ser capaz de estimular de forma eficaz o sistema imunológico dos peixes, a concentração de β -glucano maior do que a necessária provoca efeitos adversos, como inflamação excessiva e esgotamento imunológico (CHING et al., 2020). A dosagem adequada pode variar de acordo com a espécie. Tilápia suplementada com 1 g kg⁻¹ de β -glucano não mostrou mudanças no sistema imunológico (SALAH et al., 2017), mas a mesma dosagem utilizada em salmão demonstrou diferenças significativas (DOUXFILS et al., 2017).

No entanto, outros estudos mostraram que o beta-glucano administrado em outras doses teve efeitos benéficos na tilápia: SELIM e REDA, 2015 mostraram que a suplementação por via oral de 1,5 g kg⁻¹ por 60 dias incrementou o desempenho produtivo e a resistência frente a desafio com *Y. ruckeri*. Similarmente, PILARSKI et al., 2017 também determinaram que 0,1 g kg⁻¹ de β -glucano administrado por 30 dias influenciou o

desempenho produtivo e aumentou a resistência frente a *S. agalactiae*. A via de administração, e o tempo de suplementação também são variáveis a serem consideradas (CHING et al., 2020).

2.4 *Francisella orientalis*

Francisella é um gênero de bactérias pertencentes à família *Francisellaceae* que se caracterizam por ter morfologia de cocobacilos Gram-negativos pleomórficos, metabolismo estritamente aeróbicos, intracelulares facultativos e não móveis (BIRKBECK *et al.*, 2011; COLQUHOUN e DUODU, 2011; SOTO e REVAN, 2012). São consideradas bactérias fastidiosas e requerem a adição de cisteína e ferro ao ágar Mueller-Hinton para que possam ser isoladas em meio bacteriano (SOTO *et al.*, 2009; RAMÍREZ, 2017). *Francisella orientalis* é considerada um patógeno emergente na aquicultura mundial e atinge regularmente estoques comerciais e selvagens de espécies de peixes tropicais como de climas temperado (NGUYEN *et al.*, 2015; RUANE *et al.*, 2015).

A infecção causada pela *Francisella orientalis* é conhecida como franciselose e pode apresentar forma clínica aguda, sub-aguda e crônica. Em tilápias, é mais frequente a forma aguda, que corresponde a uma alta taxa de mortalidade diária, com sinais clínicos inespecíficos, como natação errática, anorexia, anemia, exoftalmia, perda de escamas, erosões cutâneas. A forma subaguda ou crônica apresenta menor taxa de mortalidade diária, mas maior morbidade, com uma maior prevalência de animais com os sinais clínicos acima descritos (BIRKBECK *et al.*, 2011; SOTO *et al.*, 2011).

Dentre das lesões macroscópicas, tem sido reportadas granulomas em órgãos parenquimatosos, como rim, baço e fígado (SOTO *et al.*, 2009; BIRKBECK *et al.*, 2011). No caso das lesões microscópicas, nas brânquias, baço, rim, fígado, coração, olhos, sistema nervoso central e trato gastrointestinal, sendo a lesão mais característica a presença de nódulos brancos multifocais generalizados (SOTO *et al.*, 2009; BIRKBECK *et al.*, 2011).

Sobre a patogênese da franciselose, sabe-se que a bactéria consegue sobreviver dentro dos macrófagos e é capaz de induzir apoptose nessas células e, também nas células endoteliais (SOTO *et al.*, 2010). Seguindo uma dispersão linfo-hematogênica, a *Francisella*

orientalis pode invadir os tecidos parenquimatosos, resultando na formação de granulomas (HSIEH *et al.*, 2006; SOTO *et al.*, 2010).

Francisella orientalis é considerada uma bactéria de difícil diagnóstico devido à dificuldade no isolamento do patógeno, presença de infecções bacterianas secundárias, tratamento com antimicrobianos e similaridade das lesões histopatológicas com outros agentes patogênicos formadores de granulomas tais como *Mycobacterium* sp. ou *Streptococcus* spp. (SOTO *et al.*, 2009; CAMUS *et al.*, 2013). Surto de franciselose ocorreram em tilápias da Ásia, Europa e América, incluindo Taiwan (CHERN e CHAO, 1994), Tailândia (NGUYEN *et al.*, 2015), China (LIN *et al.*, 2016), Reino Unido (JEFFERY *et al.*, 2010), Costa Rica (SOTO *et al.*, 2009), Estados Unidos (SOTO *et al.*, 2011), México (ORTEGA *et al.*, 2016), Chile (BOHLE *et al.*, 2009), entre outros. A franciselose é considerada uma doença endêmica na tilapicultura do Brasil (LEAL *et al.*, 2014; JATOBÁ *et al.*, 2016).

A franciselose é de difícil tratamento (SOTO *et al.*, 2012). No entanto, atualmente existem três antibióticos aprovados pela FDA, florfenicol, oxitetraciclina e sulfadimetoxina/ormetoprim, disponíveis para uso na alimentação de peixes (FDA, 2022).

Atualmente, uma das alternativas para controlar a franciselose em peixes é a inoculação de vesículas de membrana externa (OMV, *outer membrane vesicles*), estruturas biológicas eliminadas por bactérias Gram-negativas que têm sido usadas com sucesso na formulação de vacinas contra patógenos intracelulares e extracelulares devido à capacidade de estimular resposta imune inata, mediada por células e humoral (BRUDAL *et al.*, 2015). Sabendo que a *Francisella orientalis* é um problema não resolvido para a indústria da aquicultura, o uso de vacinas de OMV se apresenta como uma das alternativas para tratar essa doença (BRUDAL *et al.*, 2015).

Desta forma, por tratar-se de uma bactéria endêmica na tilapicultura brasileira com poucas opções de tratamento e de difícil diagnóstico, sua prevenção é essencial para reduzir os surtos de morbidade e mortalidade, principalmente nos meses mais frios do ano.

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar se a suplementação alimentar com β -glucano influencia na sobrevivência da tilápia-do-Nilo desafiada com *Francisella orientalis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo utilizado neste experimento está de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP (protocolo número 2351/21).

4.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados 240 juvenis de tilápia-do-Nilo (91.41 ± 7.6 g) distribuídos em doze tanques (250 L, 20 peixes por tanque) com aeração e fluxo contínuo de água. Durante o período experimental, a temperatura da água ($28,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$), pH ($7,5 \pm 0.03$), oxigênio dissolvido ($5,02 \pm 0,1$ mg L⁻¹) foram monitorados e mantidos dentro do recomendado para o conforto e bem-estar da tilápia.

4.2 Bactéria e condições de crescimento

A cepa (*Francisella orientalis*) foi obtida da coleção de cepas do Laboratório de Sanidade Aquícola (PREVET, Jaboticabal/SP.), a qual foi isolada de tilápia-do-Nilo produzidas na região de Santa Fé do Sul, SP. Para o crescimento da bactéria, esta foi semeada em placas de ágar enriquecido com cisteína a 24°C por 72 h. Após este período, colônias típicas foram transferidas para caldo BHI e incubadas sob a mesma temperatura.

4.3 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois níveis de suplementação (1 g kg⁻¹ (T1, 0,1%) e 3 g kg⁻¹ (T2, 0,3%)) de β -glucano (Macrogard® Lote QT19120, > 60%, Biorigin, Brasil) e uma dieta controle (sem adição de β -glucano) e quatro repetições. Após 15 dias de aclimação, os peixes (n=20 cada) começaram a ser

alimentados com as dietas experimentais (1,5% do peso vivo) parcelada em duas vezes ao dia (9h00 e 17h00), por um período de 30 dias.

Para ajuste da concentração bacteriana utilizada no desafio após o período de crescimento, o caldo contendo a bactéria foi centrifugado a 4°C, 1.400 g, para a formação do pellet bacteriano. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado PBS, o pellet ressuspenso e centrifugado novamente. Este processo repetiu-se duas vezes e por último foi adicionado PBS para ajuste da concentração por absorbância a 600 nm, em espectrofotômetro (UNICO). A solução foi ajustada para a densidade óptica de 0,775. Para confirmar a concentração bacteriana utilizada no desafio foi feita diluição seriada fator 10 em PBS e 100uL de cada diluição foi inoculado em ágar enriquecido com cisteína e hemoglobina e incubado a 24°C por 72 horas.

Duas caixas contendo peixes do grupo controle (C) e quatro caixas contendo peixes dos grupos T1 e T2 foram inoculados intracelomicamente com 0,1 mL de suspensão bacteriana de *F. orientalis* na dose pré-estabelecida em DL50% ($1,95 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹). As outras duas caixas do grupo controle foram inoculadas com 0,1 mL de tampão fosfato-salino (PBS), denominado como C0.

Após a inoculação da bactéria, alterações do comportamento, sinais clínicos e a mortalidade foram registradas diariamente durante 15 dias para determinação da taxa de sobrevivência, e a mortalidade acumulativa de cada tratamento avaliado.

4.4 Preparo da dieta experimental

O β-glucano foi adicionado à dieta experimental com 58 mL de carboximetilcelulosa (CMC) (3g/L) nos níveis de inclusão de 1 g kg⁻¹ e 3 g kg⁻¹ e o controle não recebeu o aditivo. A dieta base para todo o período experimental foi uma ração comercial (320g/Kg de proteína bruta, 50g/Kg de extrato etéreo, 100g/Kg de fibra bruta, 140g/Kg de matéria mineral, 15g/Kg de cálcio (mínimo), 30g/Kg de cálcio (máximo), 2,7g/Kg de fósforo, 120g/Kg de umidade, 0,2g/Kg de vitamina C) específica para peixes onívoros (Laguna – Socil, ADM).

4.5 Análise estatística

As curvas de sobrevivência foram avaliadas pelos testes de Kaplan-Meier, expressos em forma de média \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Desafio bacteriano

Quatro dias após a inoculação de *Francisella orientalis*, os peixes do grupo C e dos tratamentos T1 e T2 (suplementados com os dois níveis de β -glucano) apresentaram letargia. Sete dias após o desafio bacteriano foi constatada natação errática, anorexia, letargia nos peixes dos tratamentos C, T1 e T2, e também perda de escamas. A necropsia realizada nos peixes mortos sete dias após a inoculação da bactéria mostrou esplenomegalia nos peixes dos tratamentos C, T1 e T2. Observou-se escurecimento da pele, lesões nas nadadeiras, opacidade ocular e vesícula biliar dilatada nos peixes dos tratamentos C, T1 e T2 dez dias após a inoculação da bactéria.

5.2 Sobrevivência após o desafio com a bactéria *Francisella orientalis*

Nos peixes dos tratamentos C, T1 e T2 as primeiras mortalidades ocorreram dois dias após a inoculação da bactéria. Não foi registrada mortalidade no grupo C0 nos 15 dias de observação. No grupo controle (C) e nos peixes do T1, o número máximo de mortes foi atingido no dia terceiro dia após infecção. Nos peixes do tratamento T2, o número máximo de mortes foi atingido 15 dias após a infecção. A mortalidade dos três tratamentos cessou 15 dias após o desafio.

Os resultados demonstraram que o tratamento T2 (suplementação com 3 g kg⁻¹ de β -glucano) influenciou ($P < 0,001$) a sobrevivência das tilápias após o desafio bacteriano com *Francisella orientalis* (Figura 1). O grupo controle não inoculado (C0) não apresentou mortalidade. A confirmação da morte pela bactéria foi realizada através do reisolamento da bactéria dos rins dos peixes após o sétimo dia de inoculação.

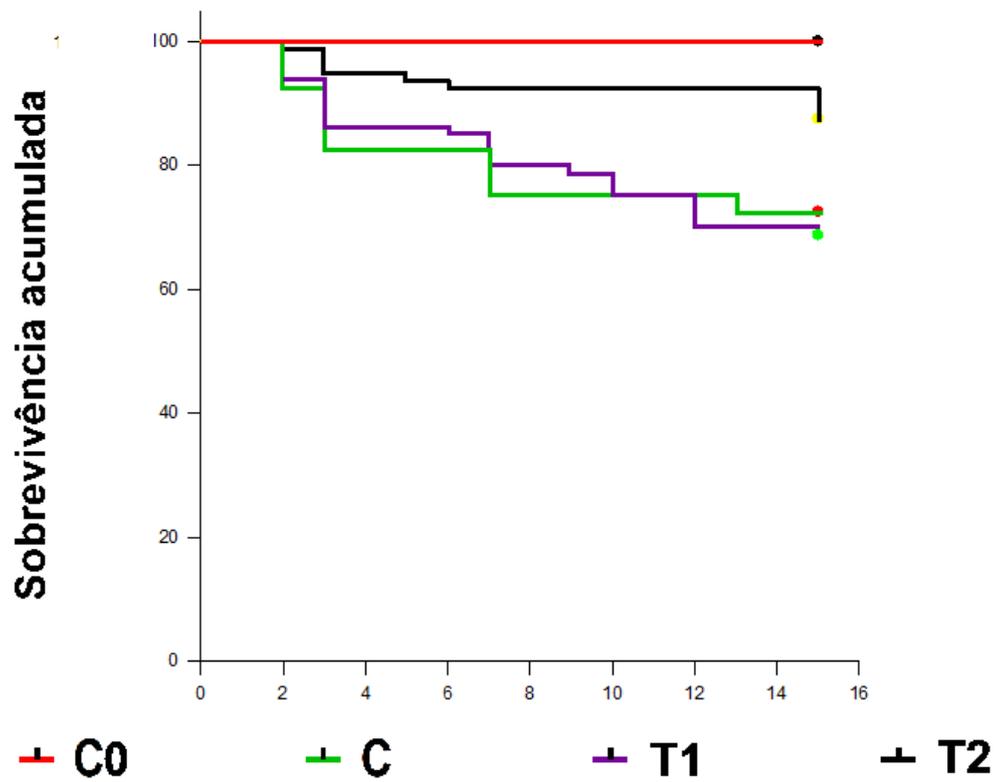


Figura 1. Porcentagem de mortalidade (%) em tilápia-do-Nilo alimentadas com duas doses de β -glucano (1 g kg^{-1} e 3 g kg^{-1}) e desafiadas *Francisella orientalis*.

6. DISCUSSÃO

Embora muitos estudos tenham demonstrado os efeitos benéficos do uso de β -glucano na saúde dos peixes (DALMO e BØGWALD, 2008; VETVICKA *et al.*, 2013; SIRIMANAPONG *et al.*, 2015; JUNG-SCHROERS *et al.*, 2016; PILARSKI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019), os autores não encontraram dados sobre o seu uso em peixes com franciselose, uma doença emergente na aquicultura mundial.

Neste estudo foram incorporadas duas doses de β -glucano na dieta de tilápias que após 30 dias de alimentação foram desafiadas com *Francisella orientalis*. Pode-se observar que os peixes alimentados com ração suplementada com 3 g kg^{-1} de β -glucano tiveram sobrevivência maior que os peixes do grupo T1 e controle. Resultados semelhantes mostraram que o β -glucano aumentou a resistência frente a bactérias *Aeromonas hydrophila* (HOSSSENY *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2019; SHERIF e MAHFOUZ, 2019), *Streptococcus iniae* (YAMAMOTO *et al.*, 2018), e *Streptococcus agalactiae* (PILARSKI *et al.*, 2017) em tilápias.

O uso β -glucano também pode ser benéfico em combinação com outros imunostimulantes. DAWOOD *et al.*, (2020) demonstraram que a suplementação oral de β -glucano em combinação com *Lactobacillus plantarum*, influenciou a resistência de tilápia-do-Nilo à *Aeromonas hydrophila*. Nesse estudo, essa resistência foi atribuída ao aumento da imunidade como resultado do uso de ambos suplementos (DAWOOD *et al.*, 2020). Similarmente, o uso de β -glucano em combinação com mananoligosacarídeos (MOS) para tilápia-do-Nilo e em outras espécies como pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi eficiente em aumentar a resistência dos peixes frente a bactérias como *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia ruckeri* (SELIM *et al.*, 2015; ABU-ELALA, *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2018).

O uso de β -glucano na dieta pode inibir a invasão e aderência de patógenos no intestino de peixes de forma eficaz, além de aumentar a contagem de leucócitos do sangue, as respostas imunes não específicas, a expressão de genes relacionados ao sistema imune, o que indica que o uso exclusivo ou em combinação com outros imunostimulantes podem

fornecer efeitos sinérgicos no sistema imunológico dos peixes (SELIM *et al.*, 2015; ABU-ELALA, *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2018; CHING *et al.*, 2020).

Neste estudo não foram observados granulomas nos órgãos parenquimatosos como rim, baço ou fígado como já foi reportado em outros casos de franciselose em tilápias (SOTO *et al.*, 2009; BIRKBECK *et al.*, 2011). Isso pode ter ocorrido devido a alta temperatura da água durante todo o período experimental ($28,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), pois em temperatura da água de até 30°C não foi possível a observação de alterações nos principais órgãos da tilápias após desafio com *Francisella* (SOTO *et al.*, 2012).

As tilápias desafiadas com *F. orientalis* mostraram esplenomegalia na necrópsia, sugerindo a ocorrência de um processo infeccioso. OLSEN *et al.*, (2006) descreveram similarmente o aumento do baço em bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) infectado com franciselose.

7. CONCLUSÃO

A suplementação alimentar com 3 g kg^{-1} de β -glucano proporcionou maior sobrevivência em juvenis de tilápia após infecção com *Francisella orientalis*.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, E.; ABDU, S.; ALI, S.; FOUAD, H. 2010, Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study, **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 323–36.

ABDEL-LATIF, H.; DAWOOD, M.; ALAGAWANY, M.; FAGGIO, C.; NOWOSAD, J.; KUCHARCZYK, D. 2022. Health benefits and potential applications of fucoidan (FCD) extracted from brown seaweeds in aquaculture: An updated review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 122, p. 115-130.

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. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 4, p. 333–341.

ALBERS, J., FERREIRA DE OLIVEIRA, C., SABBADIN, F. 2021. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 112, p. 56–63.

ADACHI, Y.; ISHII, T.; IKEDA, Y.; HOSHINO, A.; TAMURA, H.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; OHNO, N. 2004. Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin-1. 2004. **Infection and Immunity Journal**, v. 72, p. 4159–4171.

AI Q., MAI K., ZHANG L., TAN B., ZHANG W., XU W., LI H. 2007. Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394-402.

ATTAYDE J., BRASIL J., MENESCAL R. 2011. Impacts of introducing Nile tilapia on the fisheries of a tropical reservoir in North-eastern Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, v. 18, n.6, p. 437–443.

- M. BAGNI, N. ROMANO, M.G. FINOIA, L. ABELLI, G. SCAPIGLIATI, P.G. TISCAR, M. SARTI, G. MARINO. 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, p. 311-325.
- BARONY, G.; TAVARES, G.; PEREIRA, F.; CARVALHO, A.; DORELLA, F.; LEAL, C.; FIGUEIREDO, H. 2017. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Scientific Reports**, v. 7, p. 135-138.
- BARSANTI, L., PASSARELLI, V., EVANGELISTA, V., FRASSANITO, A. M., & GUALTIERI, P. 2011. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 3, p. 457.
- BILLER-TAKAHASHI, J., TAKAHASHI, L., SAITA, M., GIMBO, R., URBINATI, E., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, p. 425–429.
- BIRKBECK, T.H.; FEIST, S. W.; VERNER-JEFFREYS, D. W. 2011. *Francisella* infections in fish and shellfish. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, p. 173-87.
- BJØRGEN, H., KOPPANG, E.O. 2021. Anatomy of teleost fish immune structures and organs. **Immunogenetics** v. 73, p. 53–63.
- BOEHM, T.; BLEUL, C. C. 2007. The evolutionary history of lymphoid organs. **Nature Immunology**, v. 8, n. 2, p. 131–135.
- BOHLE, H.; TAPIA, E.; MARTÍNEZ, A.; ROZAS, M.; FIGUEROA, A.; BUSTOS. 2009. *Francisella philomiragia*, bacteria asociada con altas mortalidades en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) cultivados en balsas-jaulas en el lago Llanquihue. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 41, p. 237-244.
- BOSCHI, I.; RANDELLI, E.; BUONOCORE, F.; CASANI, D.; BERNINI, C.; FAUSTO, A. M.; SCAPIGLIATI, G. 2011. Transcription of T cell-related genes in teleost fish, and the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31 n. 5, p. 655–662.
- BRIDLE, A.R., CARTER, C.G., MORRISON, R.N., NOWAK, B.F., 2005. The effect of beta-glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon,

Salmo salar L., challenged with amoebic gill disease - evidence of inherent resistance. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 347–356.

BROWN, G. D.; TAYLOR, P. R.; REID, D. M.; WILLMENT, J. A.; WILLIAMS, D.; MARTINEZ L, WONG, S; GORDON, S. 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 407–412

BUCHMANN, K. 2014. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 459.

BYRNE, K. A., LOVING, C. L., & MCGILL, J. L. 2020. Innate Immunomodulation in Food Animals: Evidence for Trained Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11.

CAMUS, A. C.; DILL, J. A.; MCDERMOTT, A. J.; CLAUSS, T. M.; BERLINER, A. L.; BOYLAN, S. M.; SOTO, E. 2013. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in Indo-Pacific reef fish entering the United States through the ornamental fish trade. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, n. 7, p. 681-684.

CARBONERO, E.R.; MONTAI, A.V.; MELLINGER, C. G.; ELIASARO, S.; SASSAKI, G.; GORIN, P.; IACOMINI, M. 2005. Glucans of lichenized fungi: Significance for taxonomy of the genera *Parmotrema* and *Rimelia*. **Phytochemistry**. V. 66, p. 929-34.

CEBALLOS-FRANCISCO, D., GUARDIOLA, F. A., CORDERO, H., CUESTA, A., & ESTEBAN, M. Á. 2018. Humoral immune parameters in serum of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) after induced skin injury. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 75, p. 291–294.

CHAKCHOUK-MTIBAA, L. ELLEUCH, S. SMAOUI, S. NAJAH, I. SELLEM, S. ABDELKAFI, L. MELLOULI. 2014 An antilisterial bacteriocin BacFL31 produced by *Enterococcus faecium* FL31 with a novel structure containing hydroxyproline residues. **Anaerobe**, v. 271.

CHERN, R. S.; CHAO, C. B. 1994. Outbreak of a disease caused by *Rickettsia*-like organism in cultured tilapias in Taiwan. **Fish Pathology**, v. 29, p. 61–71.

CHING, J. J.; SHUIB, A. S.; ABDUL MAJID, N.; MOHD TAUFEEK, N. 2020. Immunomodulatory activity of β -glucans in fish: Relationship between β -glucan administration parameters and immune response induced. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 5, p. 1824–1845.

COLQUHOUN, D. J.; DUODU, S. 2011. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organism. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 47.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J., HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, A.D. 2001. The efficacy of a commercial-glucan preparation, EcoActiva, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from Pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 661–672.

DALMO RA, BOGWALD J. 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 384–396.

DAVIDSON GA, LIN SH, SECOMBES CJ AND ELLIS AE. 1997. Detection of specific and constitutive antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 58, p. 363-374

DAWOOD, M.A.O., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., YOKOYAMA, S., EL BASUINI, M.F., HOSSAIN, M.S., NHU, T.H., MOSS, A.S., DOSSOU, S., WEI, H., 2017. Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 148–159.

DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 251-8.

DE JESUS, R., PETIT, J., PILARSKI F., WIEGERTJES, G., KOCH, J., De OLIVEIRA, C., ZANUZZO, F. 2019. An early β -glucan bath during embryo development increases larval size of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, v. 50: p. 2012–2014.

DE SILVA S., SUBASINGHE R., BARTLEY D. & LOWTHER A. 2004. Tilapias as Alien Aquatics in Asia and the Pacific: A Review. FAO Fisheries Technical Paper, v. 453, 65 pp.

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

DOS SANTOS NMS, TAVERNE-THIELE JJ, BARNES AC, VAN MUISWINKEL WB, ELLIS AE, ROMBOUT J. 2001. The gill is a major organ for antibody secreting cell

production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. piscicida bacterin: an ontogenetic study, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 65–74.

DOS SANTOS NM, ROMANO N, DE SOUSA M. 2000. Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.10, p. 583–596.

DOUXFILS, J., FIERRO-CASTRO, C., MANDIKI, S. N. M., EMILE, W., TORT, L., KESTEMONT, P. 2017. Dietary β -glucans differentially modulate immune and stress-related gene expression in lymphoid organs from healthy and *Aeromonas hydrophila*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, 63, 285–296.

EL-MURR AEI, EL HAKIM YA, NEAMAT-ALLAH ANF, BAESHEN M, ALI HA 2019. Immune-protective, antioxidant and relative gene expression impacts of β -glucan against fipronil toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 94, p. 427–433.

ELLIS AE. 2001. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 827–839.

FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma.

FDA. 2022. Approved Aquaculture Drugs. Fda.gov. Disponível em: <<https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs>>. Acesso em: 20/04/2022

FISCHER, U.; KOPPANG, E. O.; NAKANISHI, T. 2013. Teleost T and NK cell immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 2, p. 197-206.

GANNAM, A., SCHROCK, R., 1999. Immunostimulants in Fish Diets, **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 53-89.

GANASSIN RC, BOLS NC. 1996. Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 6, p. 17-34.

- GARCIA, A.; LOPES, C.; MAHMUD, H.; SARY, C.; TODESCO, H.; PEREIRA, R. 2017. Genetic parameters for growth performance, fillet traits, and fat percentage of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 4, p. 527–533.
- GEORGOPOULOU U, VERNIER JM. 1986. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. **Developmental and Comparative Immunology**, v.10, p. 529-537.
- GÓMEZ, D.; BARTHOLOMEW, J.; SUNYER, J. 2014. Biology and mucosal immunity to myxozoans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 43, p. 243–56.
- GOPALAKANNAN, A., ARUL, V., 2009. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast: Immune response of *Cyprinus carpio* to β -glucan. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 884–892.
- GUSELLE, N.J., MARKHAM, R.J.F., SPEARE, D.J., 2007. Timing of intraperitoneal administration of beta-1,3/1,6 glucan to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), affects protection against the microsporidian *Loma salmonae*. **Journal of Fish Disease**, v. 30, p. 111–116.
- HASSANIEN, H. A.; ELNADY, M.; OBEIDA, A.; ITRIBY, H. 2004. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 587-593.
- HIBIYA T. 1994.: An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. 5–125.
- HOSSENY, H. M., MOTAAL, S. M. A., KAMEL, M. A., & EL-MURR, A. H. I. 2018. Ameliorative effect of betaglucan diet in *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas Hydrophila*. **Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 391–404.
- HSIEH, C. Y., M. C. TUNG, C. TU, C. D. CHANG, AND S. S. TSAI. 2006. Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis spp.*). **Aquaculture**, v. 254, p. 129–138.
- INGRAM GA (1980): Substances involved in the natural resistance of fish to infection a review. **Journal of Fish Biology**, v. 16, p. 23–60.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2020. Produção da Pecuária Municipal. Volume 47. Brasil. 12p.

ISHIKAWA, T.; SHIMOSE, T.; TACHIHARA, K. 2012. Life history of an invasive and unexploited population of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and geographical variation across its native and non-native ranges. **Environmental Biology of Fishes**, v. 96, p. 603–616.

JATOBÁ, A.; KLIPP, S. P.; HOPPE, R. 2016. Primeiro relato de *Francisella noatunensis* subespécie orientalis no sul do Brasil – relato de caso. **Acta Veterinaria Brasilica**, n. 10, n. 2, p. 172–176.

JEFFERY, K. R.; STONE, D.; FEIST, S. W.; VERNER-JEFFREYS, D. W. 2010. An outbreak of disease caused by *Francisella sp.* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 91, n. 2, p. 161-165.

JI L, SUN G, LI J, WANG Y, DU Y, LI X, LIU Y (2017) Effect of dietary β glucan on growth, survival and regulation of immune processes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 64, p. 56–67.

JIN, J.; XIAO, Y.; HU, H.; ZOU, Q.; LI, Y.; GAO, Y.; GE, W.; CHENG, X.; SUN, S. C. 2015. Proinflammatory TLR signalling is regulated by a TRAF2-dependent proteolysis mechanism in macrophages. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–12.

JØRGENSEN, J. 2014. The Innate Immune Response in Fish. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p.

JUNG-SCHROERS, V., ADAMEK, M., JUNG, A., HARRIS, S., DÓZA, Ö.-S., BAUMER, A., STEINHAGEN, D., 2016. Feeding of β -1,3/1,6-glucan increases the diversity of the intestinal microflora of carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 1026–1039.

KANJAN, P.; SAHASRABUDHE, N. M.; DE HAAN, B. J.; DE VOS, P. 2017. Immune effects of β -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. **Journal of Functional Foods**, n. 37, p. 433–440.

KASAHARA, M.; SUTOH, Y. 2014 Two forms of adaptive immunity in vertebrates: similarities and differences. **Advances in Immunology**, v. 122, p. 59–90.

- KHAN, A. A.; GANI, A.; MASOODI, F. A.; AMIN, F., WANI, I. A.; KHANDAY, F. A.; GANI, A. 2016. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β -d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)—Effect of γ -irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 442–450.
- KIRON, V.; KULKARNI, A.; DAHLE, D.; VASANTH, G.; LOKESH, J.; ELVEBO, O. 2016. Recognition of purified beta 1, 3/1, 6 glucan and molecular signalling in the intestine of Atlantic salmon. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 56, p. 57–66.
- KISELEVA, M., BALABANOVA, L., ELYAKOVA, L., RASSKAZOV, V., ZVYAGINTSEVA, T. 2014. Effect of treatment of chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum) eggs with 1,3;1,6-beta-D-glucans on their development and susceptibility to *Saprolegnia* infection. **Journal of Fish Disease**, n. 37, v. 1, p. 3–1.
- SELIM, K., REDA, R. 2015. Beta-glucans and mannan oligosaccharides enhance growth and immunity in Nile tilapia. **Latin American Journal of Aquatic Research**, n. 77, v. 1, p. 22–30.
- KROON-BATENBURG, L. M., KROON, J. 1997. The crystal and molecular structures of cellulose I and II. **Glycoconjugate Journal** v. 14, p. 677-90.
- KÜHLWEIN, H., EMERY, M.J., RAWLING, M.D., HARPER, G.M., MERRIFIELD, D.L., DAVIES, S.J., 2013. Effects of a dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio L.*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, 1091–1106.
- KULAC, B., GÜLÜZUR, A., MUSTAFA, C. 2012. Investigations on the ATPase activities and cadmium uptake in freshwater fish *Oreochromis niloticus* following exposures to cadmium in increased salinity. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 12, p. 861–869.
- KUMARI, J.; SAHOO, P. K. 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 5.
- LAPATRA, S.E., LAUDA, K.A., JONES, G.R., SHEWMAKER, W.S., BAYNE, C.J., 1998. Resistance to IHN virus infection in rainbow trout is increased by glucan while subsequent production of serum neutralizing activity is decreased. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 8, p. 435–446.

- LEAL, C. A.; TAVARES, G.C.; FIGUEIREDO, H. C. 2014. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 5704-5712.
- LI, P., GATLIN, D., NEILL, W. 2007. Dietary supplementation of a purified nucleotide mixture transiently enhanced growth and feed utilization of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 281-286.
- LI P., WEN Q., GATLIN III D.M. 2009. Dose-dependent influences of dietary β -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*. **Aquaculture Research**, 40,1578-1584.
- LIN, Q.; LI, N.; FU, X.; HU, Q.; CHANG, O.; LIU, L.; ZHAND, D.; WANG, G.; SAN, G.; WU, S. 2016. An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in China. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 34, n. 3, p. 460-466.
- LIU, G.; ZHU, J.; CHEN, K.; GAO, T.; YAO, H.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; LU, C. 2016. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, n. 2, p. 163-170.
- LOKESH, J.; FERNANDES, J. M.; KORSNES, K.; BERGH, Ø.; BRINCHMANN, M. F.; KIRON, V. 2012. Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 33, v.3, p. 626–631.
- LØVOLL M, DALMO RA, BØGWALD J. 2007. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 721–31.
- MAGNADOTTIR, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151.
- MAGNADOTTIR, B. 2010. Immunological control of fish diseases. **Marine Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 361-379.

- MAKI, J. L.; DICKERSON, H. W. 2003. Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 876–81.
- MEENA DK, DAS P, KUMAR S, MANDAL SC, PRUSTY AK, SINGH SK, AKHTAR MS, BEHERA BK, KUMAR K, PAL AK, MUKHERJEE SC. 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 3, p. 431-457.
- MELO D.C., OLIVEIRA D.A.A, MELO M.M., JÚNIOR D.V., TEIXEIRA E.A, GUIMARÃES S.R. 2009. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1183-1190.
- MIAN, G.; GODOY, D.; LEAL, C.; YUHARA, T.; COSTA, G.; FIGUEIREDO, H. 2009. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 180-183.
- MIEST, J.J., ARNDT, C., ADAMEK, M., STEINHAGEN, D., REUSCH, T.B., 2016. Dietary beta-glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 48, p. 94-104.
- MISRA, C.; DAS, B., MUKHERJEE, S., PATTNAIK, P. 2006. Effect of long-term administration of dietary beta-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings, **Aquaculture**, v. 255, p. 82-94.
- MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; KUMAR, V.; DEBOECK, G.; MOHANTA, K.N. 2013. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 405–430.
- MSD SAÚDE ANIMAL. AQUAVAC® STREP Sa: resumo da bula. 2012. Disponível em: <http://www.msd-saude-animal.com.br/products/Copy_of_AQUAVAC_/020_Resumo_da_Bula.aspx>.
- MUNIR, M.B., HASHIM, R., NOR, S.A.M., MARSH, T.L., 2018. Effect of dietary prebiotics and probiotics on snakehead (*Channa striata*) health: Haematology and disease resistance parameters against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 75, p. 99–108.

- NAESSENS, M., CERDOBBEL, A., SOETAERT, W., VANDAMME, E., 2005. *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 845-60.
- NAKAO M, TSUJIKURA M, ICHIKI S, VO TK, SOMAMOTO T. 2011. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches, **Developmental and Comparative Immunology**, n. 35, v. 12, p. 1296-308.
- NGUYEN, V.V.; DONG, T.H.; SENAPIN, S.; PIRARAT; N.; RODKHUM, C. 2015. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis sp.*) in Thailand. **Aquaculture Research**, v 47, p. 3697-3702.
- NIGGEMANN, J.; BOZKO, P.; BRUNS, N.; WODTKE, A.; GIESELER, M. T.; THOMAS, K.; JAHNS, C.; NIMTZ, M.; REUPKE, I.; BRÜSER, T. 2014. Baceridin, a cyclic hexapeptide from an epiphytic *Bacillus* strain, inhibits the proteasome. **ChemBioChem**, n.15, p. 1021–1029.
- OLSEN, A.; MIKALSEN, J.; RODE, M.; ALFJORDEN, A.; HOEL, E.; STRAUM-LIE, K.; HALDORSEN, R.; COLQUHOUN, D. 2006. A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 307–311.
- ORTEGA, C.; MANCERA, G.; ENRÍQUEZ, R.; VARGAS, A.; MARTÍNEZ, S.; FAJARDO, R.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; NAVARRETE, M. J.; ROMERO, A. 2016. First identification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* causing mortality in Mexican tilapia *Oreochromis spp.* **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 120, n. 3, p. 205-215, 2016.
- PEIXE BR. 2022. Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2022. Associação Brasileira de Piscicultura. 153 p.
- PILARSKI, F., DE OLIVEIRA, C.A.F., DE SOUZA, F.P.B.D., ZANUZZO, F.S., 2017. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 25–29.
- PIONNIER, N.; FALCO, A.; MIEST, J.; FROST, P.; IRNAZAROW, I.; SHRIVE, A.; HOOLE, D. 2013. Dietary β -glucan stimulate complement and C-reactive protein acute phase responses in common carp (*Cyprinus carpio*) during an *Aeromonas salmonicida* infection, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 3, p. 819-831.

- PREMARATHNA, A.; KUMARA, A.; JAYASOORIYA, A.; SATHARASINGHE, D.; PATHIRANA, E. 2018. Proximate analyses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Black tiger prawn (*Penaeus monodon*) from Sri Lanka. **Oceanography & Fisheries**, v. 7, n. 5, p. 1-5.
- PRESS, C.; EVENSEN, O. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 309-318.
- PRZYBYLSKA-DIAZ, D.A., SCHMIDT, J.G., VERA-JIMÉNEZ, N.I., STEINHAGEN, D., NIELSEN, M.E. 2013. β -glucan enriched bath directly stimulates the wound healing process in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, p. 998–1006.
- QIANG, J.; YANG, H.; HE, J.; WANG, H.; ZHU, Z. 2014. Comparative Study of the Effects of Two High-Carbohydrate Diets on Growth and Hepatic Carbohydrate Metabolic Enzyme Responses in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, p. 515-525.
- RAA, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews in Fisheries Science**, v. 4, n. 3, p. 229-288.
- RAA, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R (eds) Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición.
- RAGHIANTE, F.; DE MATTOS, M.; VAZ, M.; BIONDI, G.; MARTINS, O. 2017. *Francisella* spp. em tilápias no Brasil: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p. 119-130.
- RAMIREZ, P. J. G. 2015. The fish pathogen *Francisella orientalis*: characterization and vaccine development. PhD Thesis in Aquatic Veterinary Studies. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, United Kingdom, p. 230.
- RAMIREZ-PAREDES, J.; LARRSON, P.; THOMPSON, K.; PENMAN, D.; BUSSE, H.-J.; ÖHRMAN, C.; SJÖDIN, A.; SOTO, E.; RICHARDS, R.; ADAMS, A., COLQUHOUN, D. 2020. Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *Orientalis* Ottem *et al.* 2009 as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70: 2034-2048.

- READ, S. M.; CURRIE, G.; BACIC, A. 1996. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. **Carbohydrate Research** v. 281, p. 187-201.
- RINGØ, E.; OLSEM, R.; VECINO, J.; WADSWORTH, S.; SONG, S. 2012. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. **Journal of Marine Science: Research & Development**, v. 2, n. 1, p. 1-22.
- RODRÍGUEZ, A.; CUESTA, A.; ORTUNO, J.; ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. 2003. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.), **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V. 96, p. 183-192.
- ROMBOUT JHWM, ABELLI L, PICCHIETTI S, SCAPIGLIATI G AND KIRON V. 2010. Teleost intestinal immunology. **Fish and Shellfish Immunology**, v31, p.616-626.
- RØRSTAD, G.; AASJORD, P. M.; ROBERTSEN, B. 1993. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 3, p. 179-190.
- RUANE, N. M.; BOLTON-WARBERG, M.; RODGER, H. D.; COLQUHOUN, D. J.; GEARY, M.; MCCLEARY, S. J.; O'HALLORAN, K.; MAHER, K.; O'KEEFFE, D.; MIRIMIN, L.; HENSHILWOOD, K.; GEOGHEGAN, F.; FITZGERALD, R. D. 2015. An outbreak of francisellosis in wild-caught Celtic Sea Atlantic cod, *Gadus morhua* L., juveniles reared in captivity. **Journal of Fish Diseases**, v. 38, n. 1, p. 97-102.
- SAHOO P.K & MUKHERJEE S. C. 2001. Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 683–695.
- SAKAI, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture** 172:63-92.
- SALAH, A. S., EL NAHAS, A. F., & MAHMOUD, S. 2017. Modulatory effect of different doses of β -1, 3/1, 6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 204–213.

- SALINAS, I.; ZHANG, Y.; SUNYER, J. 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p.1346-1365.
- SALINAS, I. 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. **Biology**, v. 4, n. 3, p. 525–539.
- SCHROERS, J.; ADAMEK, M.; JUNG, A.; HARRIS, S.; DÓZA, Ö.; BAUMER, A.; STEINHAGEN. 2015. Feeding of β -1,3/1,6-glucan increases the diversity of the intestinal microflora of carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 1026-1039.
- SCHWARZ, M.H., VAN SENTEN, J., JAHNCKE, M.L., LAZUR, A.M., 2019. Overview of Good Aquaculture Practices (Report No. Publication 600-054). Virginia Cooperative Extension, Virginia Tech, Virginia State University.
- SEALEY, W.M., BARROWS, F.T., JOHANSEN, K.A., OVERTURF, K., LAPATRA, S.E., HARDY, R.W., 2007. Evaluation of the ability of partially autolyzed yeast and Grobiotic-A to improve disease resistance in rainbow trout. **North American Journal of Aquaculture**, n. 69, p. 400–406.
- SEBRAE. 2007. Salvador, Bahia. 23p.
- SECOMBES, C.; BELMONTE, R. 2016. Overview of Fish Vaccines: Focusing on Methods. In: ADAMS A. (Eds.). *Fish Vaccines*. Springer Basel, 180 p.
- SECOMBES, C.J. AND WANG, T., 2012. The innate and adaptive immune system of fish. In *Infectious disease in aquaculture*; pp. 3-68. Woodhead Publishing.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. 2005. 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**, v. 19, p. 293-306
- SHABIR, U., ALI, S., MAGRAY, A. R., GANAI, B. A., FIRDOUS, P., HASSAN, T., NAZIR, R. 2018. Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 50–56.
- SHERIF, A. H., MAHFOUZ, M. E. 2019. Immune status of *Oreochromis niloticus* experimentally infected with *Aeromonas hydrophila* following feeding with 1, 3 β -glucan and levamisole immunostimulants. **Aquaculture**, v. 509, p. 40–46.

- SHEPHARD KL (1994): Functions for fish mucus. **Reviews in Fish Biology Fisheries**, v. 4, p. 401–429.
- SHRESTHA, G.; ST CLAIR, L.; O' NEILL, K. 2015 The immunostimulating role of lichen polysaccharides: a review. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 317–322.
- SIRIMANAPONG, W., ADAMS, A., OOI, E.L., GREEN, D.M., NGUYEN, D.K., BROWDY, C.L., COLLET, B., THOMPSON, K.D., 2015. The effects of feeding immunostimulant β -glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, p. 357–366.
- SKALNIK, D. G. 2002. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. **Gene**, v. 284, n. 1-2, p. 1-21.
- SMITH VJ, DESBOIS AP, DYRYNDA EA. 2010., 'Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae', **Marine Drugs**, v. 8, p. 1213–1262.
- SOARES, M. P., OLIVEIRA, F. C., CARDOSO, I. L., URBINATI, E. C., DE CAMPOS, C. M., & HISANO, H. 2018. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 133–140
- SOLEM ST AND STENVIK J. 2006. Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 57-76.
- SONG, S.; BECK, B. R.; KIM, D.; PARK, J.; KIM, J.; KIM, H. D.; RINGØ, E. 2014 Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, p. 40–48.
- SOTO E, HAWKE JP, FERNANDEZ D, MORALES JA. 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 713-722.
- SOTO, E.; FERNANDEZ, D.; THUNE, R.; HAWKE, J. P. 2010. Interaction of *Francisella asiatica* with tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2070-2078.

- SOTO, E.; ABRAMS, S.; REVAN F. 2012. Effects of temperature and salt concentration on *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infections in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Diseases Of Aquatic Organisms**, v. 101, p. 217-223.
- SOTO, E.; BAUMGARTNER, W.; WILES, J.; HAWKE, J.P. 2011. *Francisella asiatica* as the causative agent of piscine francisellosis in cultured tilapia (*Oreochromis sp.*) in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p. 821-5.
- SOTO, E., REVAN, F. 2012. Culturability and Persistence of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (syn. *Francisella asiatica*) in Sea and Freshwater Microcosmos. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 398–404.
- TAVARES, G. C.; PALHARES, M. M. 2011. Epidemiologia, diagnóstico e controle das principais bacterioses que afetam a tilapicultura no Brasil. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**. Ano XXI, jul./ago./set. 2011
- TEWARY, A.; PATRA, B. C. 2008. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita* (Ham.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 251–259.
- THANIGAIVEL, S.; VIJAYAKUMAR, S.; GOPINATH, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N; THOMAS, J. 2015. In vivo and in vitro antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquaculture**, v. 437, p. 252–255.
- TIAN JY, XIE HX, ZHANG YA, XU Z, YAO WJ, NIE P, 2009., Ontogeny of IgM-producing cells in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* identified by in situ hybridisation', **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, p. 146–52.
- UDAYANGANI, R. M. C.; DANANJAYA, S. H. S.; FRONTE, B.; KIM, C. H.; LEE, J.; DE ZOYSA, M. 2017. Feeding of nano scale oats β -glucan enhances the host resistance against *Edwardsiella tarda* and protective immune modulation in zebrafish larvae. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 60, p. 72–77.
- URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, p. 486–503.
- VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. 2013. The effects of beta-glucan on fish immunity. **North American Journal of Medicine & Science**, v. 5, p. 580–588.

- VALLEJOS-VIDAL E, REYES-LÓPEZ F, TELES M, MACKENZIE S. 2016. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish Shellfish Immunol.** v. 56, p. 486–503.
- WANG, W.; SUN, J.; LIU, C.; XUE, Z. 2016. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 1, p. 1-23.
- XU, Z.; PARRA, D.; GÓMEZ, D.; SALINAS, I.; ZHANG, Y. L.; JØRGENSEN, L.; HEINECKE, R.; BUCHMANN, K.; LAPATRA, S.; SUNYER, J. 2013. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 32, p. 13097–13102.
- YAMAMOTO, F. Y., SUTILI, F. J., HUME, M., & GATLIN, D. M. III. 2018. The effect of β -1, 3-glucan derived from *Euglena gracilis* (Algamune™) on the innate immunological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 4, n. 10, p. 1579–1588.
- YOO, G., LEE, S., KIM, Y.C., OKORIE, O.E., PARK, G.J., HAN, Y.O., CHOI, S.-M., KANG, J.-C., SUN, M., BAI, S.C., 2007. Effects of dietary β -1,3 glucan and feed stimulants in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **The Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 138–145.
- YU, Y., WANG, Q., HUANG, Z., DING, L., & XU, Z. 2020. Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-14.
- 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 & Shellfish Immunology**. v. 65, p. 198–205.
- ZAPATA A, DIEZ B, CEJALVO T, GUTIERREZ-DE FRIAS C, CORTES A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. **Fish and Shellfish Immunology** v. 20, p. 126–136.
- ZAPATA A. 1979. Ultrastructural study of the teleost fish kidney, **Developmental and Comparative Immunology**, v. 3, p. 55–65.
- ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. 2005 The C-type lectin-like domain superfamily. **FEBS Journal**, v. 272 p. 6179–6217.

ZHANG, Z.; CHI, H.; DALMO, R. A. 2019. Trained Innate Immunity of Fish Is a Viable Approach in Larval Aquaculture. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 42.