



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**Influência do hormônio D no timo e nos aspectos zootécnicos de larvas de
tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

PEDRO ANDERSON DE PAIVA DOS SANTOS

RIO GRANDE, RS

Julho, 2024

Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**Influência do hormônio D no timo e nos aspectos zootécnicos de larvas
de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

Pedro Anderson de Paiva dos Santos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Dr. Luís Alberto Romano
Co-orientador: Dr. Oscar Pacheco Passos Neto

RIO GRANDE, RS

Julho, 2024

Ficha Catalográfica

S237i Santos, Pedro Anderson de Paiva dos.
Influência do hormônio D no timo e nos aspectos zootécnicos de
larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Pedro Anderson de
Paiva dos Santos. – 2024.
40 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS,
2024.
Orientador: Dr. Luís Alberto Romano.
Coorientador: Dr. Oscar Pacheco Passos Neto.

1. Vitamina D 2. Imunidade 3. Nutrição I. Romano, Luís Alberto
II. Passos Neto, Oscar Pacheco III. Título.

CDU 639.3.05

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

ATA 09/2024

DE DEFESA DA 239ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AQUICULTURA

No dia 31 de julho de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado em Aquicultura, do **PEDRO ANDERSON DE PAIVA DOS SANTOS**, orientado pelo **PROF. DR. LUIS ALBERTO ROMANO** composta pelos seguintes membros: **PROF. DR. OSCAR PACHECO PASSOS NETO (COORIENTADOR - UFC)**, **PROF. DR. MARCELO BORGES TESSER (IO/FURG)** e a **PROF^a. DR^a. MARTA DA COSTA KLOSTERHOFF (UNIPAMPA)**. Título da dissertação: "**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO D NO TIMO E NOS ASPECTOS ZOOTÉCNICOS DE LARVAS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**". Dando início à defesa, o Coordenador do PPGAq, Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Luis Alberto Romano, que na qualidade de orientador, passou a palavra para o candidato apresentar a Dissertação. Após ampla discussão entre os membros da Banca e o candidato, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da dissertação, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. O candidato **PEDRO ANDERSON DE PAIVA DOS SANTOS** foi considerado **APROVADO**, devendo a versão definitiva da Dissertação ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pelo candidato e pelo Coordenador em exercício do PPGAq.

PROF. DR. LUIS ALBERTO ROMANO (Orientador – IO/FURG)

PROF. DR. OSCAR PACHECO PASSOS NETO (Coorientador – UFC)

PROF. DR. MARCELO BORGES TESSER (IO/FURG)

PROF^a. DR^a. MARTA DA COSTA KLOSTERHOFF (UNIPAMPA)

PEDRO ANDERSON DE PAIVA DOS SANTOS

PROF. DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES (Coordenador do PPGAq)

Sumário	
RESUMO	1
ABSTRACT.....	2
1 Introdução Geral.....	3
1.1 Aquicultura.....	3
1.1.1 Tilápia do Nilo	4
1.2 Sistema Imunológico dos peixes	4
1.2.1 Sistema Imunológico Inespecífico ou Inato	5
1.2.2 Sistema Imune Específico ou Adaptativo	7
1.3 Timo	8
1.4 Hormônio D	10
2 Objetivos.....	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 Material e métodos	14
3.1 Certificado comitê de Ética Animal	14
3.2 Obtenção das larvas experimentais	14
3.3 Delineamento experimental	14
3.4 Parâmetros Zootécnicos.....	16
3.4 Coleta de Amostras.....	16
3.5 Análise histológica das Amostras.....	17
3.6 Análise Estatística	17
4 Resultados.....	18
4.1 Qualidade de Água	18
4.2 Zootécnicos	18
4.3 Área do timo	19
5 Discussão	21
5.1 Qualidade de água.....	21
5.2 Aspectos zootécnicos	21
5.3 Timo	22
Conclusão	23
Referências	24

Agradecimentos

Quero expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho. Em primeiro lugar, agradeço sinceramente ao meu orientador, Luis Alberto Romano, pela orientação constante, paciência e incentivo ao longo deste processo. E ao meu co-orientador Oscar Pacheco Passos Neto. O apoio e conhecimento de vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Gostaria também de agradecer aos membros da banca examinadora, Marcelo Tesser e Marta Klosterhoff.

À minha família, minha mãe Angela de Paiva dos Santos, meu pai Paulo Francinildo Teixeira dos Santos, ao meu irmão Paulo Angelo de Paiva dos Santos, a minha cunhada Pauleana, ao meu padrinho Francisco de Assis Saraiva Carneiro que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo seu amor, apoio e compreensão, sou imensamente grato. Seu encorajamento foi essencial para superar os desafios deste caminho acadêmico.

Agradeço as minhas colegas de laboratório, que sem elas não poderia finalizar minha pesquisa sem sombra de dúvidas, Luana Giesta e Virginia Pedrosa, fizeram meus dias no laboratório os melhores, aprendi muito com vocês.

A minha equipe de pesquisa que tive a honra de ter durante o experimento que realizei na UFC, Heloisa, Kimberlly e Fabio, vocês me ajudaram muito antes e durante o experimento, o apoio de vocês que fez com que fosse realizado o experimento.

Gostaria de agradecer aos meus amigos Bianca Ramiro, Otavio Pimentel, Mayra, Andrezza Chargas, Hellyjúnyor Brandão. Vocês foram essenciais nessa caminhada, me incentivando e apoiando nos momentos felizes e tristes.

Gostaria de agradecer ao meu melhor amigo Davi Cerqueira, que me apoiou durante toda minha jornada de mestrado, me incentivou, ajudou quando precisei, foi um grande companheiro durante todo esse período.

Quero agradecer a minha melhor amiga Raysa Sena, que esteve presente durante essa minha jornada, me apoiando tanto nos meus estudos como sendo uma âncora para a minha

vida social, nas nossas saídas, academia e todas as noites de jantar que tivemos juntos após o dia da EMA.

Agradeço pelos meus colegas de alojamento, que foram bastante receptivos na minha chegada, nesse 1 ano de convivência tive momentos alegres e divertidos.

Por fim, agradeço a todos, familiares e amigos que estiveram ao meu lado durante essa caminhada que direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho, seja com palavras de encorajamento, recursos ou inspiração. Vocês foram parte fundamental dessa jornada.

1 **RESUMO**

2

3 A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, é uma das espécie de peixe mais comercializada
4 do mundo. Por conta do seu fácil manejo e sua capacidade de consumir alimento inerte
5 desde a primeira alimentação, torna-se uma excelente espécie na aquicultura.
6 Recentemente cientistas constataram que a Vitamina D deve ser considerada um
7 hormônio. Estudos mais atuais apontam o papel fisiológico do hormônio D na regulação
8 da imunidade inata e adaptativa. Apesar dos esforços para ampliação do conhecimento
9 atual sobre o sistema imune de peixes, este ainda é limitado em comparação com o
10 existente para mamíferos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar
11 diferentes níveis de inclusão de hormônio D sobre a tilápia do Nilo (*Oreochromis*
12 *niloticus*) analisando o timo e seus aspectos zootécnicos. O experimento foi realizado na
13 Estação de Aquicultura da UFC durante o período de 56 dias em tanques de 250 L e
14 aeração constante. Foram utilizadas larvas de tilápia do Nilo com 2-3 dias pós eclosão,
15 com o intuito de verificar a influência que a adição do hormônio D pode ter no timo e nos
16 aspectos zootécnicos. Foram analisados os parâmetros físico-químicos da água e seus
17 nitrogenados ao longo do experimento. Os aspectos zootécnicos foram mensurados no
18 final do experimento, para averiguar o efeito do hormônio D. Os cortes histológicos foram
19 analisados pelo programa Zen lite para mensurar o tamanho do timo. Os resultados
20 trouxeram que o hormônio D influencia nos aspectos zootécnicos, tendo todos os
21 tratamentos que tiveram adição do hormônio uma melhora nos parâmetros de peso e
22 tamanho. Em relação a área do timo a adição de hormônio na ração gerou um aumento
23 nele quando comparado com o controle. Com isso, concluiu-se que a concentração de
24 135.000 UI/kg se mostrou a mais adequada para larvas de tilápia do Nilo alimentadas
25 pelo período de 56 dias.

26

27 **Palavras-chave:** Vitamina D; Imunidade; nutrição.

28

29

30

31 **ABSTRACT**

32

33 Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, is one of the most commercialized fish species in the
34 world. Due to its easy handling and its ability to consume inert food from the first feeding,
35 it has become an excellent species for aquaculture. Scientists have recently concluded
36 that Vitamin D should be considered a hormone. More recent studies indicate the
37 physiological role of hormone D in the regulation of innate and adaptive immunity.
38 Despite efforts to expand current knowledge about the immune system of fish, this is still
39 limited compared to that existing for mammals. Thus, the present study aimed to evaluate
40 different levels of inclusion of hormone D in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by
41 analyzing the thymus and its zootechnical aspects. The experiment was carried out at the
42 UFC Aquaculture Station for a period of 56 days in 250 L tanks with constant aeration.
43 Nile tilapia larvae were used 2-3 days after hatching to verify the influence that the
44 addition of hormone D may have on the thymus and zootechnical aspects. The physical-
45 chemical parameters of the water and its nitrogenous compounds were analyzed
46 throughout the experiment. Zootechnical aspects were measured at the end of the
47 experiment to verify the effect of hormone D. The histological sections were analyzed by
48 the Zen lite program to measure the size of the thymus. The results showed that hormone
49 D influences zootechnical aspects, with all treatments that had the addition of the
50 hormone showing an improvement in weight and size parameters. Regarding the thymus
51 area, the addition of hormone to the feed generated an increase in it when compared to
52 the control. Thus, it was concluded that the concentration of 135,000 IU/kg was the most
53 suitable for Nile tilapia larvae fed for a period of 56 days.

54

55 **Keywords:** Vitamin D; Immunity; Nutrition.

56

57

58

59

60

61

62 1 Introdução Geral

63 1.1 Aquicultura

64 Com o aumento da demanda por alimento devido ao crescimento populacional,
65 a exploração dos recursos pesqueiros chegou ao ponto da população natural das espécies
66 não conseguirem se recuperar, gerando assim uma estagnação na produção de pescado
67 oriundo da pesca (FAO, 2024). Por conta disso a necessidade de manter a produção de
68 pescado no mercado fez com que fosse utilizado a técnica de cultivo de organismos
69 aquáticos em cativeiro para suprir a demanda existente, já que somente a pesca não
70 conseguia manter a produção de pescado suficiente para a população (Jiang, 2010).

71 A aquicultura que já era praticada no oriente começou a se popularizar nas
72 demais regiões, para ajudar na demanda do comércio, com protocolos e técnicas cada vez
73 mais otimizadas e com o intuito de um aumento de produção (Waldige e Caseiro, 2004).
74 Atualmente a produção de pescado oriundo da aquicultura ultrapassa o da pesca, com
75 uma produção de mais de 94 milhões de toneladas (FAO, 2024). Esse aumento na
76 produção de pescado na aquicultura vem por conta das evoluções tecnológicas dos
77 últimos anos (Yue *et al.*, 2016). As espécies mais cultivadas atualmente no mundo são o
78 camarão branco do Pacífico, *Penaeus vannamei*, ostras com concha nei, *Crassostrea spp.*,
79 carpa capim, *Ctenopharyngodon idellus*, tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* e a carpa
80 prateada, *Hypophthalmichthys molitrix*, com produções superando os 6 milhões de
81 toneladas, cada espécie (FAO, 2024).

82 Dentre os peixes mais produzidos do mundo a tilápia do Nilo assume a 2º em
83 produção geral, juntando os dados da produção de pesca e da produção da aquicultura,
84 sendo que na produção oriunda da aquicultura a tilápia do Nilo é a 3º (Abwao *et al.*, 2021;
85 FAO, 2024).

86 A demanda pela tilápia do Nilo vem crescendo nos últimos anos em todo o
87 mundo, se tornando um produto bem aceito não somente entre as classes mais baixas,
88 como também nas classes média e alta (El-Sayed, 2006; Asiedu *et al.*, 2016; FAO, 2024).

89 No Brasil a produção de tilápia no ano de 2023 foi de 579.080 toneladas, tendo
90 nos últimos 10 anos um aumento de mais de 103% segundo a Associação Peixe BR
91 (Associação Brasileira da Piscicultura), mostrando o quanto essa produção só tende a

92 crescer nos próximos anos, prova disso é a aquicultura tornando-se a produtora de
93 proteína animal que mais cresceu no país. Em termos gerais a tilápia participa de mais de
94 65% da produção nacional de peixe, sendo a espécie mais cultivada no Brasil, destaque
95 para o estado do Paraná que é o maior produtor de tilápia do país, representando 36% da
96 produção total (Peixe BR, 2024).

97 **1.1.1 Tilápia do Nilo**

98 Essa espécie de peixe é oriunda da África, mas se popularizou mundialmente
99 devido suas características rústicas, crescimento rápido, reprodução rápida, tolerância a
100 variação de parâmetros físico-químico da água, adaptação a diferentes fontes de alimento
101 e manejo fácil. Essas características possibilitam seu cultivo em diferentes regiões do
102 mundo, e adaptação a produção em diferentes sistemas, viabilizando o aumento da
103 produção nos últimos anos tendo um mercado bem consolidado e com ótimos preços (Ng
104 e Romano, 2013; El-Sayed e Fitzsimmons, 2023).

105 Os estágios iniciais de desenvolvimento da espécie são divididos em duas etapas,
106 a fase larval que se dá a partir da diminuição do saco vitelino, que demora entre 5 e 13
107 dias pós eclosão dependendo da temperatura; e a fase de juvenil que se dá após os 13 dias
108 de eclosão, sendo essa a fase que se começa a ofertar a ração (Fujimura e Okada, 2007).
109 A tilápia é uma das poucas espécies que, após o consumo do vitelo, aceita a ração inerte
110 como fonte de alimento, possibilitando o baixo orçamento de mão de obra, diferente de
111 outros peixes que necessitam do alimento vivo como primeira fonte de alimento exógeno.

112 **1.2 Sistema Imunológico dos Peixes**

113 Na aquicultura, o estudo das enfermidades, suas causas e mecanismos de defesa
114 é importante para o sucesso de um cultivo, pois as doenças são uma das principais causas
115 de perdas econômicas em todo mundo (Ozório *et al.*, 2004). Isso se dá devido aos manejos
116 que ocorrem durante a criação de peixes, como transporte, biometrias, deterioração da
117 qualidade de água e a alta densidade de estocagem que podem ocorrer durante toda a
118 criação, trazendo estresse ao peixe. Nesse sentido, contar com o sistema imune ativo e
119 eficaz diminui a suscetibilidade a doenças. Uma vez que o sistema imunológico esteja
120 debilitado devido o estresse, torna propício o aparecimento de patógenos (Lieke *et al.*,
121 2020).

122 O sistema imunológico é um conjunto de órgãos, tecidos, células e moléculas
123 que tem como função diferenciar o que é próprio e o não próprio. Em todos os vertebrados
124 esse sistema permite rejeitar uma imensa quantidade de antígenos biológicos ou não
125 biológicos (Olabuenaga, 2000; Rauta *et al.*, 2012; Romano, 2012).

126 No caso específico do ambiente aquático, os peixes são expostos continuamente
127 a uma ampla gama de microrganismos que atingem todas as barreiras epiteliais do corpo,
128 no qual esses organismos apresentam uma resposta imune bem desenvolvida e integrada,
129 não sendo apenas condicionada pelo ambiente em particular, mas também pela natureza
130 poiquilotérmica dos peixes (Olabuenaga, 2000; Rauta *et al.*, 2012; Salinas, 2015).

131 O sistema imunológico pode ser dividido em dois tipos: inato ou inespecífico e
132 adquirido ou específico, ambos compostos por uma parte humoral e uma celular
133 (Olabuenaga, 2000; Press e Evensen, 1999; Secombes e Ellis, 2012). Sua atuação pode
134 variar com a idade do peixe e é influenciada por diferentes fatores (Olabuenaga, 2000).
135 Do ponto de vista evolutivo, os peixes são considerados a primeira classe de vertebrados
136 com imunidade inata e adaptativa. Sua imunidade adaptativa se sustenta devido a aparição
137 do sistema de tecido linfoide e a memória imunológica (Warr, 1995).

138

139 **1.2.1 Sistema Imunológico Inespecífico ou Inato**

140 O sistema imunológico inespecífico, também conhecido como sistema imune
141 inato, é caracterizado por ser antígeno-independente. Isso significa que a resposta
142 imunológica gerada é semelhante, independentemente do tipo de antígeno presente. A
143 exposição repetida ao mesmo antígeno não resulta em uma resposta imunológica
144 aprimorada, ou seja, não há desenvolvimento de memória imunológica (Turvey e Broide,
145 2010).

146 O sistema imunológico inespecífico é constituído por 3 mecanismos de defesa,
147 barreiras físicas, componentes celular e humoral que atuam de maneira integrada para
148 prevenir a entrada e disseminação de patógenos (Magnadóttir, 2006; Romano, 2012). A
149 pele, por exemplo, serve como uma barreira física robusta contra a invasão de
150 microrganismos. Além de sua resistência física, a pele secreta muco em abundância, que

151 contém lisozima, uma enzima bactericida amplamente presente nas mucosas,
152 contribuindo para a eliminação de agentes patogênicos (Ángeles Esteban, 2012).

153 Este sistema está sustentado pela fagocitose produzida por macrófagos isolados
154 ou macrófagos organizados no sistema fagocítico mononuclear (Romano, 2012). Este
155 sistema representa a primeira linha de defesa contra a invasão de agentes patogênicos,
156 desempenhando um papel essencial no controle inicial de muitas infecções sem a
157 necessidade de ativação do sistema imune específico (Levraud e Boudino, 2009).

158 As principais células envolvidas na resposta imunológica inespecífica são, como
159 mencionados anteriormente, os macrófagos. Estes desempenham um papel crucial na
160 fagocitose de substâncias estranhas, tanto abióticas quanto bióticas, incluindo diversos
161 patógenos. Alguns dos macrófagos se unem a receptores de complexos maior de
162 histocompatibilidade (CMH), se transformando em células apresentadoras de antígenos
163 (APCs). Assim, também participam na resposta imunológica específica, criando uma
164 conexão entre a resposta imune inespecífica e a específica. Logo, essas células
165 demonstram uma heterogeneidade funcional que vai além da simples fagocitose
166 (Romano, 2012; Romano *et al.*, 2021)

167 Os macrófagos estão em constante trânsito entre os tecidos centrais
168 hematopoiéticos, como o rim anterior, onde se diferenciam em diversas células
169 fagocíticas, incluindo os macrófagos fixos ou histiócitos. Além disso, os monócitos-
170 macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos (Male *et al.*, 2006; Romano,
171 2012).

172 Os macrófagos presentes nos tecidos estão estrategicamente distribuídos por
173 todo o corpo, constituindo o sistema fagocitário mononuclear (SFM). A análise das
174 células histiocíticas deve inicialmente considerar sua capacidade funcional para
175 enquadrar adequadamente seus caracteres morfológicos e imunohistoquímicos (Male *et*
176 *al.*, 2006).

177 O conhecimento atual sobre o macrófago confirma seu papel central em todos
178 os tecidos como célula de defesa e interação. O papel defensivo é amplamente
179 reconhecido. No entanto, a função de interação que envolve a ação mútua entre dois ou

180 mais agentes, forças ou funções, destaca atividades que transcendem a fagocitose,
181 estendendo-se até coparticipações permanentes com outras células (Ferguson, 1989). Nos
182 peixes, este sistema está plenamente desenvolvido, com células fagocitárias circulando
183 no sangue e presentes em outros tecidos.

184 As respostas humorais são mediadas por macromoléculas sintetizadas por
185 células e liberadas nos fluidos extracelulares. Entre os componentes humorais estudados
186 em peixes destacam-se o sistema complemento, a lisozima, os peptídeos antimicrobianos
187 e as proteínas de fase aguda. Esses componentes desempenham diversas funções, como
188 promoção da inflamação, facilitação da fagocitose e efeitos bactericidas diretos (Smith,
189 Rise e Christian, 2019).

190 Durante os estágios iniciais do desenvolvimento dos peixes, a imunidade inata
191 exerce um papel contínuo nas respostas imunológicas rápidas, assegurando proteção às
192 larvas enquanto a capacidade imunológica adaptativa ainda é limitada (Vadstein *et al.*,
193 2013).

194 **1.2.2 Sistema Imune Específico ou Adaptativo**

195 O sistema imune específico, também conhecido como adaptativo, é
196 caracterizado por ser antígeno-dependente, ou seja, gera uma resposta altamente
197 específica contra uma região particular do patógeno, conhecida como antígeno (Abbas *et*
198 *al.*, 2007). Esse sistema envolve a proliferação de linfócitos que produzem anticorpos ou
199 células citotóxicas específicas para cada antígeno e o desenvolvimento de memória
200 imunológica, permitindo entre outras coisas a produção de vacinas para proteger humanos
201 e animais contra agentes infecciosos (Marsden *et al.*, 1996; Trichet, 2010).

202 O sistema imune apresenta uma individualidade interespecie geneticamente
203 marcada pelo complexo principal de histocompatibilidade, que faz com que o indivíduo
204 seja único e irrepetível. Consequentemente, há uma tendência inerente a rejeição de
205 tecidos implantados de uma espécie diferente (xenogênico) ou de um indivíduo da mesma
206 espécie (alôgênico). Durante a vida de um indivíduo e ao longo do desenvolvimento
207 evolutivo, este complexo sistema imunológico tem permitido resistir a ação deletéria de
208 vários agentes nocivos (Cushing, 1975; Cooper, 2003; Beckman, 2005).

209 A imunidade específica pode ser subdividida em dois tipos de resposta: a
210 imunidade humoral e a imunidade celular, representadas pelos linfócitos B e T,
211 respectivamente (Rubio-Godoy, 2010). Durante a ontogenia do sistema imune, os
212 linfócitos que migram do rim anterior ou pronéfron para o timo adquirem receptores
213 específicos de células T (CD3 - dependentes do timo). Nos peixes, os linfócitos B
214 adquirem seus receptores específicos no pronéfron – formando assim uma população
215 linfocitária mista (T e B) (Nielsen e Esteve-Gassent, 2006).

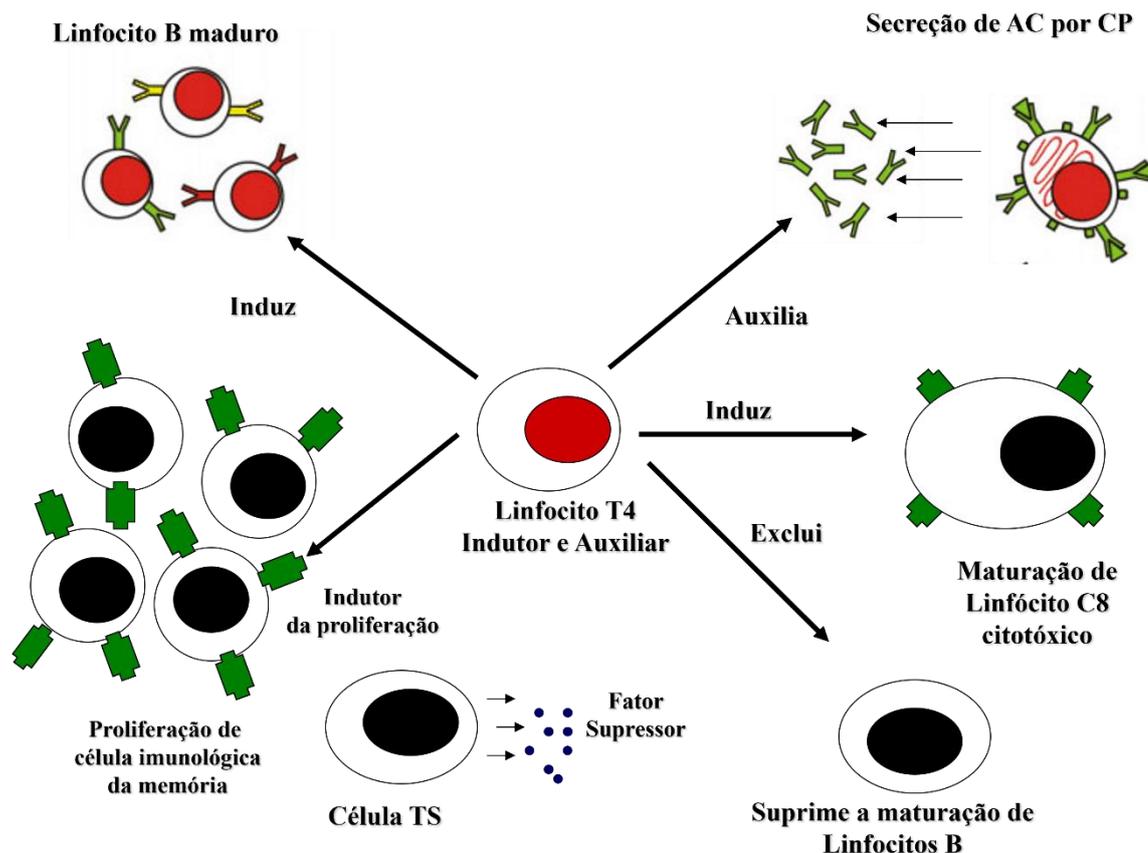
216 Determinados antígenos estimulam a imunidade humoral, mediada pelos
217 linfócitos B, que sintetizam um tipo de imunoglobulina M (IgM,) além dessa são descritos
218 recentemente presença de outras imunoglobinas, imunoglobinas T (IgT) e D (IgD) e a
219 imunoglobina TA que circula no soro sanguíneo. Outros antígenos estimulam a
220 imunidade celular ou dependente do timo. As células T não produzem anticorpos
221 circulantes, mas se diferenciam em células T citotóxicas (CD8) que neutralizam o
222 antígeno (Stoskopf, 1993; Cain *et al.*, 2002; Hordvik, 2015; Bounocore *et al.*, 2017).

223 Foi verificado a presença de imunidade adaptativa em larvas de tilápia do Nilo
224 com 30 dias. Após vacinação foi constatada a presença de Imunoglobinas e CD4
225 (Kumwan *et al.*, 2023).

226 **1.3 Timó**

227 O pronéfron (rim) é o centro linfematopoiético mais importante do peixe,
228 exercendo função similar a medula óssea dos mamíferos. O rim produz somente dois tipos
229 de célula linfóides: o linfócito B e linfócitos sem marcação molecular nenhuma, que
230 migram ao timo.

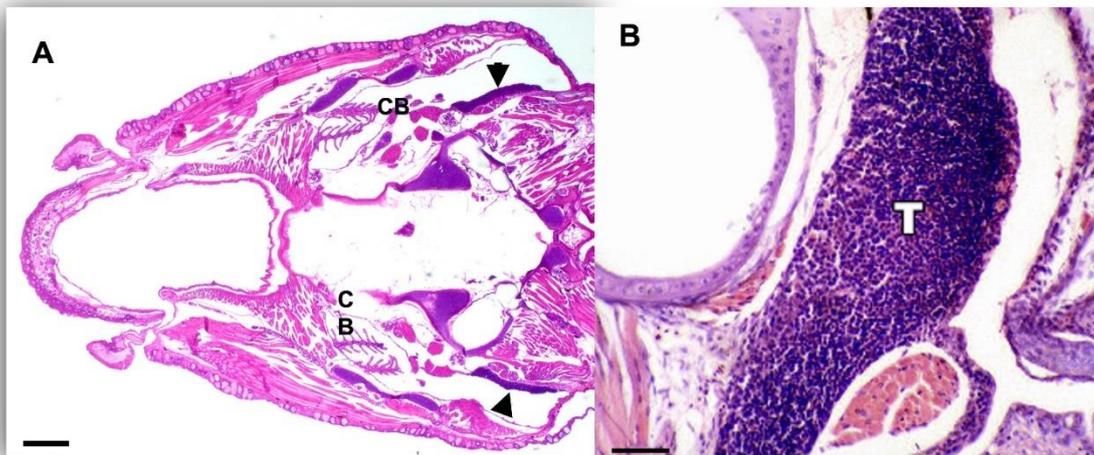
231 O timo é um dos órgãos principais do sistema linfoide, responsável pelo
 232 desenvolvimento dos linfócitos T. Ele representa o centro de atividades imunológicas. Os
 233 linfócitos ingressados ao timo recebem o receptor CD3, posteriormente vão adquirindo
 234 outros receptores, como o CD8 e CD4 (Dixon e Stet, 2001; da Costa Klosterhoff *et al.*,
 235 2020). O CD4 forma linfócito T4 (auxiliar ao sistema imune) que tem um papel
 236 importante na resposta imune tanto inespecífica como na específica figura 1.



237 **Figura 1**-Papel central desempenhado pelo linfócito T4, na ativação do sistema imune específico
 238 humoral e celular. Induz a proliferação das células T8 citotóxicas, gera memória imunológica,
 239 induz a síntese de anticorpos pelo linfócito B e interage com a célula apresentadora de antígeno e
 240 suprime a resposta imunológica. (Romano, 2012).

241 O timo exerce nos peixes importância na formação do sistema imune e nas suas
 242 respostas imunológicas (Dos Santos *et al.*, 2000; Thapa e Farber, 2019). É um órgão
 243 linfoepitelial formado pela interação de células epiteliais com células linfoides pouco
 244 diferenciadas. Diferente dos mamíferos, nos peixes o timo não possui divisão entre córtex
 245 e medula (de Medeiros, Pedrosa e Romano, 2021). Nos peixes de água doce o timo é o
 246 primeiro órgão imunocompetente a se tornar linfoide, diferente dos de água salgada onde
 247 é o rim anterior (Romano *et al.*, 1999b ; Zapata et al. 2006).

248 O timo é um órgão pareado, bilateral, estando localizado sob a lateral do epitélio
249 da faringe, nas laterais dorsais e alojado na parte interna superior das câmaras branquiais
250 figura 2.A (da Costa Klosterhoff *et al.*, 2020). Sua origem ontogênica se dá a partir de
251 duas camadas germinativas: endoderma e mesoderma (Boehm *et al.*, 2003; Gordon *et al.*,
252 2004). O timo é constituído de células da série linfocítica, células epiteliais e macrófagos
253 (fagócitos) figura 2.B (De Medeiros, Pedrosa e Romano, 2021).



254 **Figura 2A-** Se observa um corte longitudinal de juvenil de tilápia. Visualiza-se em cada lado da
255 câmara branquial a estrutura tímica (seta) que sobressai a câmara branquial (CB). H. E. BAR:
256 400 μ **Figura 2B-** Se observa o timo (T) da mesma espécie. É possível perceber que não há
257 separação entre córtex e medula. É formado por uma população uniforme de linfócitos. H. E.
258 BAR: 20 μ

259 Diferente de outros órgãos do sistema linfoide, o timo possui um período de
260 atividade, onde exerce sua função e depois começa a atrofiar. A involução do timo está
261 mais associada à maturação sexual e desova do que com o avanço da vida do peixe,
262 conforme observado em diferentes espécies (Barraza *et al.*, 2020). Na Tilápia do Nilo,
263 observou-se a degeneração do timo a partir do 6^o mês de vida, sendo que a maturação
264 sexual da Tilápia ocorre entre o 4^o e 6^o mês de vida (Cao *et al.*, 2017).

265 **1.4 Hormônio D**

266 Recentemente cientistas constataram que a vitamina D deve ser considerada um
267 hormônio, isso se dá devido as várias funções que o hormônio D tem no nosso organismo.
268 Nos mamíferos o hormônio D é produzido no organismo na pele, por uma reação
269 fotoquímica induzida pela luz UV, o que não ocorre com as vitaminas em geral. Quando

270 o corpo não é capaz de sintetizar as vitaminas, é necessário adicionar na dieta até os níveis
271 adequados para a espécie (Ellison e Moran, 2021).

272 A vitamina D, que é um hormônio esteroide que atua por meio do receptor de
273 vitamina D (VDR) induzindo a expressão de várias proteínas de ligação e transporte de
274 cálcio no intestino para estimular a captação ativa de cálcio, preservando a
275 normocalcemia e, indiretamente, mantendo a mineralização óssea (Darias *et al.*, 2011;
276 Mok, 2013).

277 Além das suas ações no metabolismo do cálcio e dos ossos, exhibe uma ampla
278 gama de efeitos regulatórios sobre o crescimento, proliferação, apoptose e função das
279 células do sistema imunológico (Mok, 2013).

280 No ambiente aquático, aceita-se, em termos gerais, que o hormônio D deve ser
281 fornecido pela dieta, pois usualmente os peixes não são capazes de sintetizá-lo (Bills,
282 1927). Em ambiente natural eles absorvem a vitamina produzida por ação da luz UV sobre
283 o plâncton próximo à superfície da água (Fraser, 2018).

284 Sabe-se que a truta arco-íris (*Onchorrhynchus mykiss*), é capaz de produzir
285 colecalciferol na pele quando exposta à luz azul visível (Pierens e Fraser, 2015).
286 Demonstrou-se em estudos que a tilápia moçambicana não conseguiu sintetizar o hormônio
287 D3 ao receber colecalciferol na ausência de luz. Ao ser exposta a luz solar, e receber o
288 colecalciferol, foi observado um aumento nos níveis do hormônio (Sunitarao e
289 Raghuramulu, 1997). Animais de cativeiro, contudo, precisam receber a suplementação
290 por meio da dieta conforme o tamanho e espécie do peixe.

291 O metabolismo deste hormônio nos tecidos de peixes só foi demonstrado pela
292 primeira vez por Henry e Norman, (1974) e as suas ações não clássicas foram
293 reconhecidas pela primeira vez só 5 anos mais tarde, quando foram detectados receptores
294 da 1,25-dihidroxitamina D3 ativa (1,25(OH)₂D₃) em várias linhas celulares neoplásicas
295 humanas em cultivo.

296 Os peixes conseguem acumular hormônio D no fígado e no tecido adiposo sendo
297 a hormônio D3 a principal forma de armazenamento e de maior biodisponibilidade nestes
298 animais. No entanto, a importância fisiológica desse metabolismo e os mecanismos e

299 locais de ação dos metabólitos são pouco conhecidos (Takeuchi *et al.*, 1984; Lock *et al.*,
300 2010; Darias *et al.*, 2011).

301 Shiau e Huang (1993) realizaram estudos de toxicidade de hormônio D3. A partir
302 disso, definiram a dose tóxica de colecalciferol como sendo acima de 375 mg, para o
303 híbrido de *Oreochomis niloticus* x *O. aureus*.

304 O papel do hormônio D na modulação do sistema imunológico é apoiado pela
305 presença do receptor da vitamina D (RVD) nas células dos sistemas imune inato e
306 adaptativo, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B e células T (Arnson *et*
307 *al.*, 2007; Haussler *et al.*, 1998; Hewison, 2010; Mok, 2013).

308 Em geral, parece que o hormônio D estimula as respostas imunes inatas e modula
309 a imunidade adaptativa, gerando maior tolerância imunológica. Em relação a doenças
310 infecciosas, o hormônio D parece aumentar a quimiotaxia, a fagocitose e a produção de
311 proteínas antimicrobianas (Mathieu, 2011). Vários tem sido os estudos que relatam a
312 relação entre o hormônio D e o sistema imune.

313 Waters *et al.*, (2004) demonstraram que o hormônio D aumenta a destruição de
314 micobactérias por meio de um mecanismo que é dependente do óxido nítrico em ratos
315 infectados com *Mycobacterium bovis*. Vasilyevna Belyaeva *et al.*, (2017) e Yuk *et al.*,
316 (2009) observaram que o hormônio D gera um aumento na atividade antimicrobiana
317 contra *M. tuberculosis* induzindo autofagia em monócitos humanos por meio de
318 catelicidina, um peptídeo antimicrobiano que também demonstra uma resposta reduzida
319 associada à deficiência do hormônio D em doenças pulmonares granulomatosas
320 infecciosas e autoimunes.

321 Zhang *et al.*, (2023) realizou um trabalho com carpa capim com adição do
322 hormônio D para observar o efeito dela sobre uma exposição a *Aeromonas hydrophila*,
323 tendo como conclusão a necessidade de uma concentração mínima de 1150 UI/Kg de
324 hormônio D na dieta dessa espécie. Ao incluir hormônio D na alimentação, as carpas
325 tiveram uma melhora nas funções imunológicas e aumento das enzimas antioxidantes,
326 melhorando as atividades antimicrobianas, trazendo benefícios para a espécie.

327 Dessa forma, o tratamento das doenças de peixes apresenta várias dificuldades,
328 principalmente o uso de medicamentos como antibióticos, que podem trazer riscos tanto

329 para os cultivos, quanto para saúde humana, além de possibilitar a aquisição de resistência
330 por parte dos microrganismos (Alderman e Hastings, 1998).

331 Estudos da inclusão do hormônio D em ração na tilápia nos últimos anos vem
332 sendo focado somente na influência dessa vitamina na composição cálcio e fósforo
333 inorgânico no organismo do animal, não sendo voltado ao efeito de altas dosagens que o
334 hormônio D pode influenciar na parte imunológica (O'Connell e Gatlin III, 1994;
335 Hussein, Metwally e Asmaa, 2021).

336 Sabendo disso o timo se mostra um órgão de interesse para a pesquisa de
337 imunidade, já que nos peixes de água doce é o primeiro órgão a se torna linfóide. Ademais,
338 presume-se que ele seja um dos primeiros órgãos linfóides a ser influenciado pela inclusão
339 do hormônio D na ração.

340 Sendo assim, a possibilidade de se utilizar a tilápia como modelo experimental
341 se torna bastante benéfico, devido sua fácil criação em cultivo e sua capacidade de receber
342 alimentação inerte desde o consumo do saco vitelino, facilitando a possibilidade de
343 observação do efeito do hormônio D no espécime, já que não é necessário utilizar um
344 vetor biológico para realizar a aplicação desse aditivo. Com isso, essas características
345 fazem com que a espécie seja escolhida como modelo neste trabalho.

346 **2 Objetivos**

347 **2.1 Objetivo Geral**

348 Avaliar o efeito do hormônio D sobre o timo e nos aspectos zootécnicos na tilápia
349 do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

350 **2.2 Objetivos Específicos**

351 Verificar a influência da adição do hormônio D na ração em larva de tilápia do
352 Nilo sobre a área do timo em cortes histológicos.

353 Observar a influência da adição do hormônio D na ração em larva de tilápia do
354 Nilo sobre os parâmetros zootécnicos: peso final, biomassa final, tamanho e taxa de
355 sobrevivência.

356

357 **3 Material e Métodos**

358 **3.1 Certificado comitê de Ética Animal**

359 O experimento obteve aprovação do comitê de Ética Animal (CEUA) da
360 Universidade Federal do Ceará com o número de protocolo 1605202401.

361 **3.2 Obtenção das Larvas Experimentais**

362 As larvas de tilápia do Nilo foram obtidas a partir de doação da Empresa
363 Bomar localizada no município de Icarai de Amontada-CE. A aquisição foi aprovada
364 pelo gerente responsável pela parte da piscicultura da empresa. Foram adquiridos num
365 total 5000 larvas com um peso médio de 0,001g recém eclodidas com a presença do
366 saco vitelino, que era um dos requisitos para o início do experimento. As larvas foram
367 transportadas da empresa até a mediação da Estação de Aquicultura da UFC onde o
368 experimento foi realizado.

369 **3.3 Delineamento Experimental**

370 No total foram utilizadas 3.750 larvas com peso médio de 0,001 g com 2-3
371 dias pós eclosão que foram distribuídas de forma aleatória em 15 tanques de 250 L
372 totalizando 250 larvas por tanque. As larvas começaram a serem alimentadas após um
373 dia de estocagem devido o experimento ter sido iniciado com as larvas ainda com a
374 presença do saco vitelino. Foi utilizado uma ração comercial com 55% de proteína
375 bruta e 9% de lipídios (ração em pó) durante os primeiros 21 dias experimentais. Após
376 esse período foi feita a alimentação concomitante com uma ração com 45% de
377 proteína bruta e 9% de lipídio (ração de 0.8 a 1.0 mm) até a finalização do experimento
378 seguindo protocolo já utilizado no laboratório para porcentagem de arraçoamento e
379 para porcentagem de cada ração durante o experimento, as larvas foram alimentadas
380 4 vezes durante o dia (09, 11:30, 14:30 e 17h). O cálculo da quantidade de ração foi
381 feito com base nas biometrias semanais realizadas. Durante as primeiras 4 semanas
382 foram utilizados 15% da biomassa total de cada tratamento e nas 3 semanas seguinte
383 foi utilizado 10%.

384 Foram utilizadas rações comerciais no experimento. A ração em pó foi da
385 marca Nutripiscis (tabela 1) e a de granulometria 0.8 a 1.0 foi da Wean Prime (tabela
386 2).

387

Tabela 1. Níveis de garantia da ração em pó Nutripiscis.

Níveis de Garantia	
Umidade (%max)	12
Proteína Bruta (%min)	45/40*
Lipídeos (%min)	8,0/7,0*
Fibra (%max)	4,0/5,0**
Matéria Mineral (%max)	15,0
Calcio (g/kg)	10 - 30**
Fosforo (g/kg)	10/8,5*
Sódio (mg/kg)	3.500 / 3.000*
Vitamina A (UI/kg)	15.000
Vitamina C (mg/kg)	1000
Vitamina D3 (UI/kg)	3000
Vitamina E (UI/kg)	400
Vitamina K3 (mg/kg)	12,5
Vitamina B1 (mg/kg)	25,0
Vitamina B2 (mg/kg)	30,0

388

Legenda: * nível mínimo; ** nível máximo.

389

Tabela 2. Níveis de garantia da ração de 0.8 a 1.0 mm da Wean Prime.

Níveis de Garantia	
Umidade (%max)	13
Proteína Bruta (%min)	55
Lipídeos (%min)	9
Fibra (%max)	4,0
Matéria Mineral (%max)	20
Calcio (g/kg)	25 - 40*
Fosforo (g/kg)	20
Sódio (mg/kg)	5000
Vitamina A (UI/kg)	12000
Vitamina C (mg/kg)	750
Vitamina D3 (UI/kg)	2500
Vitamina E (UI/kg)	150
Vitamina K3 (mg/kg)	10
Vitamina B1 (mg/kg)	20,0
Vitamina B2 (mg/kg)	25,0

390

Legenda: *Nível máximo.

391

392

393

394

395

As rações com adição de vitamina D foi preparada na própria estação encorpendo-a a partir da adição de óleo (óleo de soja) e da vitamina D na concentração de 10.000.000UI/L, a proporção adicionada foi calculada a partir da base que a ração controle tinha acrescentado a quantidade de cada tratamento. Devido a utilização de duas granulometria diferentes foi colocado como controle a concentração de 5.000UI

396 por kg de ração além da adição de 1,5% de óleo. Essa padronização de vitamina D na
397 ração controle se deu devido a concentração já presente nas rações utilizadas, devido
398 na ração em pó ter 3.000 UI/kg e a ração de 0.8 a 1.0 mm ter 2.500 UI/kg de vitamina
399 D3 na sua composição. Os tratamentos foram adicionados de vitamina D a partir da
400 ração controle (5.000UI/Kg) até os valores desejados.

401 O experimento constitui de 5 tratamentos, tratamento controle-TC
402 (5.000UI/kg), tratamento com adição de 5.000 UI de vitamina D3-T5 (10.000UI/kg),
403 tratamento com adição de 15.000 UI de vitamina D3-T15 (20.000UI/kg), tratamento
404 com adição de 45.000 UI de vitamina D3-T45 (50.000UI/kg) e tratamento com adição
405 de 135.000 UI de vitamina D3-T135 (140.000UI/kg), com uma duração de 7 semanas.

406 Durante esse período diariamente foi realizado a mediação de oxigênio
407 dissolvido (OD) e temperatura (°C) com oxímetro e de pH com um medidor digital
408 de pH. A amônia, nitrito e alcalinidade foram medidos 2 vezes por semana por kits
409 colorimétricos da Camarágua. O experimento foi realizado em sistema estático com
410 troca d'água conforme a necessidade e reposição por evaporação.

411 **3.4 Parâmetros Zootécnicos**

412 Ao final do experimento foi realizado uma biometria total com os peixes, onde
413 foram medidos com paquímetro e pesados em balança de precisão de 3 casas decimais.

414 A taxa de sobrevivência foi calculada conforme a equação I e a biomassa inicial
415 e final foi calculada com base da equação II.

$$416 \quad \text{Sobrevivência} = (\text{Larvas finais} / \text{Larvas iniciais}) \times 100 \quad (\text{I})$$

$$417 \quad \text{Biomassa} = \text{número de indivíduos} \times \text{peso} \quad (\text{II})$$

418 **3.4 Coleta de Amostras**

419 Previamente ao início da fase experimental, 10 larvas foram coletadas e
420 realizado um choque térmico para fazer a eutanásia dessas larvas. O mesmo protocolo de
421 eutanásia foi utilizado para as 5 larvas de cada tanque que foram coletadas do dia 1 ao dia
422 15, e nos dias 17, 19, 21, 23, 25, 28. Nos dias 49, 53 e 56 foram coletados 3 peixes devido
423 ao aumento do tamanho após o início do experimento.

424 As larvas de peixe foram fixadas com formol tamponado 10% e mantidos nessa
425 solução por 10 dias. Após esse período foram transferidas para álcool 70% e mantidas até
426 o processamento.

427

428 **3.5 Análise Histológica das Amostras**

429 As larvas amostradas, após a fixação, foram processadas no processador
430 automático de tecidos LEICA TP1020, com inclusão em Paraplast. Após o
431 emblocamento, os blocos foram cortados a 5 µm no micrótomo LEICA RM2245. Para
432 ajudar na identificação do timo os “cortes” das amostras foram corados com azul de
433 metileno, onde após observado a presença do timo os “cortes” de amostras resultantes
434 desse processo foram pescadas com lâminas para microscopia e desparafinizados em
435 estufa.

436 Para as análises histológicas e morfométricas, as lâminas foram coradas com
437 hematoxilina e eosina (Luna, 1968) e posteriormente observadas no microscópio óptico
438 Zeiss Primo Star equipado com uma câmera AxioCam ERC5s - AxionVision (LE). As
439 imagens resultantes foram levadas para análise morfométrica por meio do software Zen
440 lite.

441

442 **3.6 Análise Estatística**

443 Foi verificada a normalidade e a homocedasticidade dos dados, utilizando os
444 testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Uma vez que os pressupostos da
445 ANOVA foram atendidos, foi realizada uma ANOVA de uma via, e após foi realizado o
446 teste post-hoc de Tukey para verificar a diferença entre os tratamentos no mesmo dia para
447 a área do timo e para os demais dados entre os tratamentos. Um nível mínimo de
448 significância de 5% ($p < 0,05$) foi aplicado em todas as análises. O software utilizado foi
449 o Past.

450

451

452 4 Resultados

453 4.1 Qualidade de Água

454 Os valores médios de oxigênio dissolvido (OD), temperatura (C°), pH, amônia
455 total (N-AT) e nitrito podem ser observados na tabela 3.

456 Tabela 3. Parâmetros de qualidade de água (média ± desvio padrão) dos tratamentos:
457 Controle (TC), Adição de 5.000UI/Kg VD3 (T5), Adição de 15.000UI/Kg VD3 (T15), Adição de
458 45.000UI/Kg VD3 (T45), Adição de 135.000UI/Kg VD3 (T135), durante os 56 dias de
459 experimento.

Parâmetros	TC	T5	T15	T45	T135
OD (mg.L ⁻¹)	6,97±1,0a	6,83±0,94a	6,94±0,94 ^a	7,1±1,03a	6,84±1,06a
Temp. (C°)	27,1±1,1a	27,24±1,06a	27,41±1,14 ^a	27,4±0,99a	27,27±1,01a
pH	7,3±0,3a	7,01±0,36a	7,11±0,38 ^a	7,5±0,37a	6,99±0,39a
N-AT (mg.L ⁻¹)	0,33±0,26b	0,38±0,32c	0,34±0,34b	0,3±0,2 ^a	0,4±0,3c
Nitrito (mg.L ⁻¹)	1,28±1,02c	1,02±0,91a	1,57±2,73d	1,3±1,5c	1,05±0,91b

460 Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os
461 tratamentos após ANOVA de uma via após Teste de Tukey.

462 Após análise de alcalinidade quando abaixo de 80 mg CaCO₃/L foi realizado a
463 correção para 100 mg CaCO₃/L com carbonato de cálcio.

464

465 4.2 Zootécnicos

466 O aumento do peso das larvas conforme a adição de VD3 na dieta pode ser
467 visualizado na figura 3.

468

469

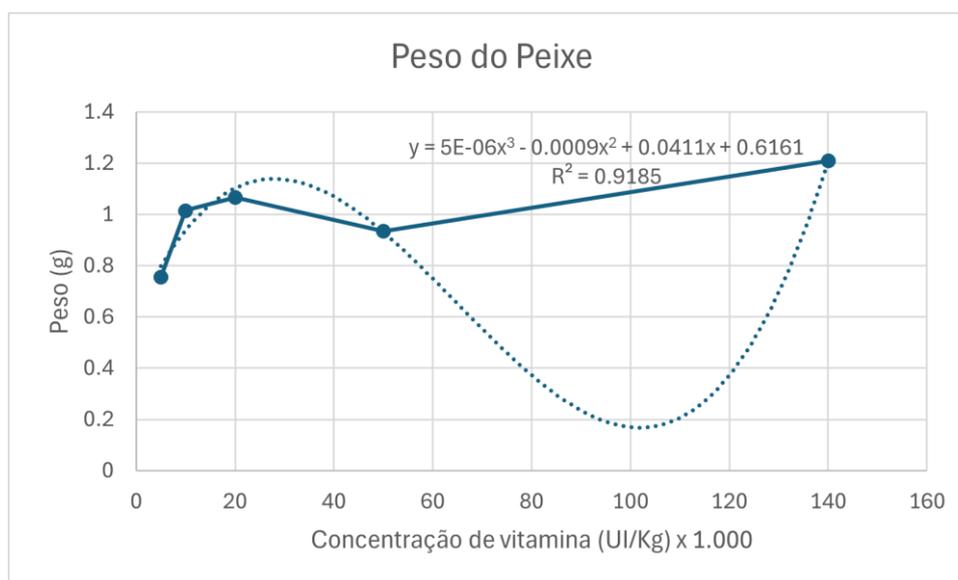
470

471

472

473

474



475 Figura 3- Peso final das larvas alimentadas com diferentes concentrações de VD3 na dieta.

476 Os parâmetros de peso inicial, peso final, comprimento, biomassa inicial,
 477 biomassa final e sobrevivência de larva de tilápia do Nilo em resposta aos níveis de adição
 478 de hormônio D3 na dieta são apresentados na tabela 2. Tanto o peso quanto o
 479 comprimento da tilápia do Nilo aumentaram conforme a adição de hormônio D3, com
 480 isso o melhor resultado de peso e comprimento foi observado na concentração de 135.000
 481 UI/kg de hormônio D3, onde foi observado diferença significativa entre os tratamentos
 482 ($p < 0,05$).

483 Em relação a sobrevivência não foi observado diferença significativa entre o
 484 controle e os demais tratamentos, tendo somente diferença entre o tratamento 45 e o 135
 485 ($p < 0,05$) tabela 4.

486 Tabela 4. Desempenho zootécnico da Tilapia do Nilo *O. niloticus* (média \pm desvio padrão) nos
 487 tratamentos TC, T5, T15, T45, T135, durante os 56 dias de experimento.

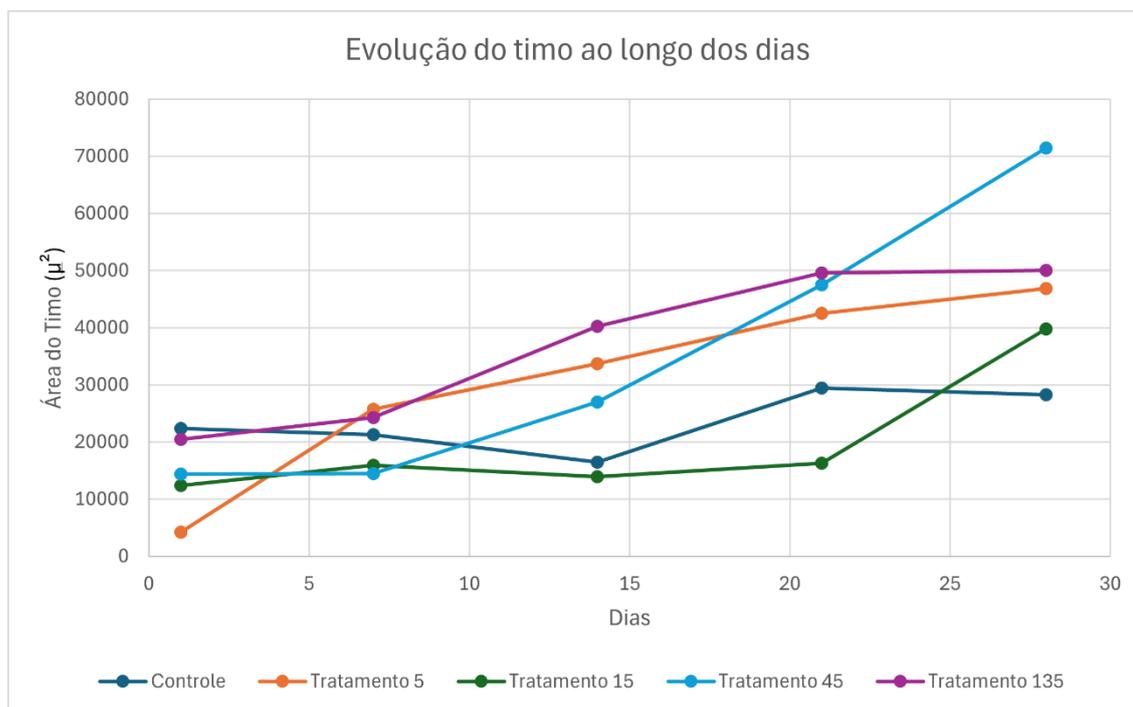
Parâmetros	C	5	15	45	135
Peso Inicial (g)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Biomassa inicial (g)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Peso médio Final (g)	0,755 \pm 0,020d	1,015 \pm 0,036bc	1,065 \pm 0,012b	0,935 \pm 0,045c	1,21 \pm 0,008a
Biomassa final (g)	80,42 \pm 5,17dc	96,66 \pm 13,45c	116,44 \pm 0,75b	73,84 \pm 2,2d	136,59 \pm 0,75a
Tamanho (cm)	3,3 \pm 0,08d	3,7 \pm 0,08bc	3,85 \pm 0,04b	3,6 \pm 0,08c	4,1 \pm 0,08a
Sobrevivência (%)	70 \pm 0,32ab	71,45 \pm 11,8ab	80,35 \pm 1,51ab	64,05 \pm 5,76b	83,3 \pm 0,9a

488 Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos
 489 após ANOVA de uma via após Teste de Tukey.

490

491 4.3 Área do Timo

492 Foi realizada a medição da área do timo demarcando todos os bordos do órgão.
 493 Essa medição foi feita utilizando o software Zen lite e as fermentas disponíveis no
 494 programa para essa finalidade. Com base nos resultados obtidos, foi escolhido o intervalo
 495 de uma semana até completar 30 dias. Os resultados obtidos foram resumidos para melhor
 496 entendimento e disponibilizado na figura 4 e tabela 5.



497

498 Figura 4- Gráfico demonstrando o tamanho do timo com o passar dos dias (dia zero a dia
499 30), nas larvas alimentadas com diferentes concentrações de VD3 na dieta.

500

501 Tabela 5- Área média do timo (μ^2) nos dias 1, 7, 14, 21 e 28, nas larvas alimentadas com
502 diferentes concentrações de VD3 na dieta.

503

504

505

506

507

508

509

510

511

Dia	Tratamentos				
	C	5	15	45	135
1	22354,03 ±1157,64a	4237,542 ±754,26c	12421,31 ±475,11b	14381,87 ±2565,51b	20427,63 ±842,39a
7	21312,47 ±6458,17a	25759,73 ±10218,50a	15957,1 ±1126,2a	14506,11 ±4684,82a	24267,97 ±218,87a
14	16497,88 ±1975,86d	33696,11 ±851,25b	13910,14 ±140,15d	26979,58 ±2526,62c	40228,91 ±368,22a
21	29394,56 ±7916,46bc	42476,27 ±5298,64ab	16285,3 ±1042,5c	47495,57 ±22,87a	49598,56 ±1955,23a
28	28284,44 ±9138,41c	46880,91 ±439,98bc	39735,09 ±1955,01bc	71454,01 ±5607,81a	50064,91 ±9666,28ab

512

513

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro no mesmo dia por meio de ANOVA de uma via após Teste de Tukey.

514 **5 Discussão**

515 **5.1 Qualidade de Água**

516 No presente estudo os valores do oxigênio dissolvido ficou entre 6,83 e 7,1 mg.L⁻¹,
517 esses valores segundo o autor Popma & Lovshin, (1996) estão dentro do recomendado,
518 que para se ter um melhor crescimento da tilápia os valores tem que ser acima de 3,0
519 mg.L⁻¹. Em relação as medias da temperatura que ficaram próximas de 27 °C estão dentro
520 do recomendado para a espécie que é de 25°C a 32°C, não sendo problema para o
521 crescimento (El-Sayed, 2006). O valor do pH nesse estudo ficou em torno dos 7 a 7,5,
522 estando dentro da faixa de pH ótimo para a tilapia que é entre 6 e 8 (Ostrensky e Boeger,
523 1998).

524 O valor da amônia médio foi abaixo de 0,5 mg.L⁻¹, o CL50₄₈ para larvas de
525 tilápia é de 1,007 mg.L⁻¹ Benli *et al.* (2005), sendo assim os valores médios do estudo
526 ficaram abaixo do letal para a espécie, já que durante o experimento não se teve pico de
527 amônia maior que 1,0 mg. L⁻¹. Quando ocorria esses picos de amônia era realizado a troca
528 de água. Já em relação ao nitrito os valores não ultrapassaram 1,6 mg.L⁻¹, sendo valores
529 bem abaixo do que Atwood *et al.* (2001) relatou como sendo a CI50₉₆ que para juvenil de
530 tilápia (4,4 ± 1,5) sendo 81 mg.L⁻¹. O limite da toxicidade do nitrito depende do tamanho
531 do peixe, no caso da tilápia peixes menores são mais tolerantes que peixes maiores
532 (Atwood *et al.*, 2001).

533 Os parâmetros de qualidade de água sugerem que eles não interferiram nos
534 resultados observados.

535 **5.2 Aspectos Zootécnicos**

536 Wang *et al.* (2024) observou que com a adição da vitamina D ocorria um
537 aumento no crescimento da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) até a concentração
538 de 1.200 UI/Kg, tendo observado que nas concentrações mais altas ocorria a diminuição
539 do peso e do comprimento das carpas. No presente trabalho foi observado que altas
540 dosagens de hormônio D3 podem contribuir com o aumento do peso e tamanho da tilápia
541 do Nilo, sendo a maior dosagem 135.000 UI/Kg a que teve o melhor resultado. Diferente
542 de outros trabalhos onde o excesso de hormônio D não ajudava no crescimento do peixe
543 no estudo em questão a maior concentração teve influência no crescimento da tilápia do

544 Nilo, comprovando que a concentração de hormônio D recomendada difere com base na
545 espécie e estágio do peixe (Miao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020; He *et*
546 *al.*, 2021; Lin *et al.*, 2022).

547 Como não foi observado diferença significativa na sobrevivência das larvas nos
548 diferentes tratamentos, o hormônio D3 não influenciou nesse índice, esse mesmo
549 resultado foi observado por Wang *et al.* (2024), onde a inclusão de hormônio D3 não
550 interferiu na sobrevivência da carpa capim.

551 **5.3 Timo**

552 Nos peixes, o timo desempenha importante papel no sistema imune e suas
553 respostas imunológicas (Dos Santos *et al.*, 2000; Thapa e Farber, 2019).

554 Sabendo da importância que o timo tem no sistema imune, foi medido a área do
555 órgão no intuito de estimar a concentração da população de linfócitos no timo. Kernen *et*
556 *al.* (2020) observou que conforme a área do timo, houve um aumento do número de
557 timocitos, que aumentaram proporcionalmente a área do timo. Assim, podemos supor que
558 devido o aumento da área do timo com a adição de hormônio D3, os números de timocitos
559 aumentaram. Por conta do aumento de células T podemos pressupor que a resposta imune
560 adaptativa dos peixes teve uma melhora, já que as células T desempenham um papel
561 muito importante para o sistema imune (Nakanishi, Shibakasi e Matsuura, 2015). Da
562 mesma forma pode-se imaginar que há um aumento também das enzimas e outras
563 substâncias envolvidas na resposta imune inata a partir da influência do hormônio D.

564 Trabalhos realizados com a adição do hormônio D voltados para a imunidade
565 dos peixes comprovou o efeito no sistema imune de diferentes espécies, tendo
566 participação tanto na melhora do sistema imune inato quanto no sistema imune adaptativo
567 (Zhang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020; He *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2022). Conforme
568 comentado anteriormente, cada espécie de peixe necessita de diferentes concentrações de
569 hormônio D para melhores resultados. De acordo com alguns estudos, observa-se uma
570 correlação entre os índices zootécnicos e as respostas imunológicas (Wu *et al.*, 2020;
571 Wang *et al.*, 2023).

572 Ao analisar o timo da tilápias submetidas a altas concentrações de hormônio D3,
573 observou-se uma melhora nos aspectos zootécnicos. Quanto à produção de linfócitos e

574 imunidade inata, resultados similares foram encontrados. Wu *et al.*, (2020) observou que
575 a adição de hormônio D quando comparada com a deficiência mostrou uma melhora na
576 resposta imunológica inespecífica, tendo melhores resultados em concentrações baixas
577 para carpa preta (*Mylopharyngodon piceus*). Contudo, com base nos resultados obtidos
578 no presente trabalho, é possível inferir que a tilápia possui uma boa resposta com altas
579 dosagens de hormônio D, apresentado bons parâmetros zootécnicos e maior área do timo.

580 **Conclusão**

581 Com isso podemos concluir que a adição de hormônio D em altas dosagens trazem
582 melhoras para o desempenho zootécnico da larva de tilápia do Nilo, sendo que a
583 concentração de 135.000 UI/Kg demonstrou ser mais eficiente que as demais
584 concentrações. Sendo que comparado com as demais concentrações ela obteve os
585 melhores resultados de peso, biomassa e tamanho dos indivíduos no período avaliado.

586 Em relação a área do timo, após 2 semanas foi observado que as maiores dosagens
587 utilizadas no presente trabalho de hormônio D apresentaram uma maior área do timo.
588 Sendo que as concentrações de 45.000 e 135.000 UI/Kg obtiveram os melhores
589 resultados, não tendo diferença significativa entre elas.

590 Correlacionado os resultados obtidos dos índices zootécnicos e da área do timo, a
591 concentração de 135.000 UI/kg se mostrou a mais adequada para a larva de tilápia do
592 Nilo alimentadas pelo período de 56 dias nas condições desse trabalho.

593 Esses resultados nos encorajam a investigar a influência do hormônio D nas demais etapas
594 do ciclo produtivo da tilápia.

595

596

597

598

599

600

601

602

603 **Referências**

- 604 Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. 2007. Cellular and molecular immunology 6th
605 edition.
- 606 Abwao, J., Jung'a, J., Barasa, J.E., Kyule, D., Opiyo, M., Awuor, J.F., Keya, G.A., 2023.
607 Selective breeding of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: a strategy for increased genetic
608 diversity and sustainable development of aquaculture in Kenya. *Journal of Applied*
609 *Aquaculture*, 35(2), 237-256. <https://doi.org/10.1080/10454438.2021.1958728>
- 610 Alderman, D.J., Hastings, T.S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of
611 antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. Technol.* 33,
612 139–155. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1998.3320139.x>
- 613 Ángeles Esteban, M., 2012. An overview of the immunological defenses in fish
614 skin. *International scholarly research notices*, 2012(1), 853470.
615 <https://doi.org/10.5402/2012/853470>
- 616 Arnson, Y., Amital, H., Shoenfeld, Y., 2007. Vitamin D and autoimmunity: new
617 aetiological and therapeutic considerations. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 1137–1142.
618 <https://doi.org/10.1136/ard.2007.069831>
- 619 Asiedu, B., Failler, P., Beyens, Y., 2016. Enhancing aquaculture development: mapping
620 the tilapia aquaculture value chain in Ghana. *Reviews in Aquaculture*, 8(4), 394-402.
621 <https://doi.org/10.1111/raq.12103>
- 622 Atwood, H.L., Fontenot, Q.C., Tomasso, J.R., Isely, J.J., 2001. Toxicity of nitrite to Nile
623 tilapia: effect of fish size and environmental chloride. *North American Journal of*
624 *Aquaculture*, 63(1), 49-51. [https://doi.org/10.1577/1548-](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2001)063%3C0049:TONTNT%3E2.0.CO;2)
625 [8454\(2001\)063%3C0049:TONTNT%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2001)063%3C0049:TONTNT%3E2.0.CO;2)
- 626 Barraza, F., Montero, R., Wong-Benito, V., Valenzuela, H., Godoy-Guzmán, C., Guzmán,
627 F., ..., Imarai, M., 2020. Revisiting the teleost thymus: current knowledge and future
628 perspectives. *Biology*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.3390/biology10010008>

- 629 Beckman, M., 2005. Jawless fish have form of adaptive immunity. *Science*, 310(5756),
630 1892-1893. <https://doi.org/10.1126/science.310.5756.1892b>
- 631 Benli, A.Ç.K., Köksal, G., 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis*
632 *niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary & Animal*
633 *Sciences*, 29(2), 339-344.
- 634 Bills, C. E., 1927. Antirickettic Substances. VI. The Distribution of Vitamin D, with some
635 Notes on its Possible Origin.
- 636 Boehm, T., Bleul, C.C., Schorpp, M., 2003. Genetic dissection of thymus development in
637 mouse and zebrafish. *Immunological reviews*, 195(1), 15-27.
638 <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00070.x>
- 639 Buonocore, F., Stocchi, V., Nunez-Ortiz, N., Randelli, E., Gerdol, M., Pallavicini, A., ...
640 & Picchiatti, S. (2017). Immunoglobulin T from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.):
641 molecular characterization, tissue localization and expression after nodavirus
642 infection. *BMC molecular biology*, 18, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12867-017-0085-0>
- 643 Cain, K.D., Jones, D.R., Raison, R.L., 2002. Antibody–antigen kinetics following
644 immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a T-cell dependent
645 antigen. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(2), 181-190.
646 [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00063-5](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00063-5)
- 647 Cao, J., Chen, Q., Lu, M., Hu, X., Wang, M., 2017. Histology and ultrastructure of the
648 thymus during development in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of*
649 *Anatomy*, 230(5), 720-733. <https://doi.org/10.1111/joa.12597>
- 650 Cooper, E.L., 2003. Comparative immunology. *Current pharmaceutical design*, 9(2),
651 119-131. <https://doi.org/10.2174/1381612033392297>
- 652 Cushing, J. (1977). Immunology and the processes for evolution. *Developmental &*
653 *Comparative Immunology*, 1(1), 65-69. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(77\)80052-9](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(77)80052-9)

654 da Costa Klosterhoff, M., de Medeiros, A. F. F., Guerreiro, A., Pedrosa, V. F., & Romano,
655 L. A. (2020). Comparative histology of the human and teleost fish thymus. *Brazilian*
656 *Journal of Development*, 6(9), 68460-68481.

657 Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L.,
658 2011. Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the
659 skeletal system. *Aquaculture* 315, 49–60.
660 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.030>

661 de Medeiros, A. F. F., Pedrosa, V. F., & Romano, L. A. (2021). Ultrastructural study of
662 the thymus of *Mugil liza* Valenciennes, 1836 juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*
663 *Reports*, 2. <https://doi.org/10.1016%2Fj.fsirep.2020.100005>

664 Dixon, B., & Stet, R. J. M. (2001). The relationship between major histocompatibility
665 receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental & Comparative*
666 *Immunology*, 25(8-9), 683-699. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00030-1)

667 dos Santos, N.M., Romano, N., de Sousa, M., Ellis, A.E., Rombout, J.H., 2000. Ontogeny
668 of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish & shellfish*
669 *immunology*, 10(7), 583-596.

670 Ellison, D.L., Moran, H.R., 2021. Vitamin D: vitamin or hormone?. *Nursing*
671 *Clinics*, 56(1), 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2020.10.004>

672 El-Sayed, A.F.M. (Ed.), 2006. *Tilapia culture*. CABI publishing.
673 <https://doi.org/10.1079/9780851990149.0000>

674 El-Sayed, A.F.M., Fitzsimmons, K., 2023. From Africa to the world—The journey of Nile
675 tilapia. *Reviews in Aquaculture*, 15, 6-21. <https://doi.org/10.1111/raq.12738>

676 FAO. 2024. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation in*
677 *action*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>

678 Ferguson, H. W. (1989). *Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue*
679 *responses in diseases of teleosts* (pp. 263-pp).

680 Fraser, D.R., 2018. Evolutionary biology: Mysteries of vitamin D in fish. In *Vitamin*
681 *D* (pp. 13-27). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00002-1>

682 Fujimura, K., Okada, N., 2007. Development of the embryo, larva and early juvenile of
683 Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging
684 system. *Development, growth & differentiation*, 49(4), 301-324.
685 <https://doi.org/10.1111/j.1440-169x.2007.00926.x>

686 Gordon, J., Wilson, V.A., Blair, N.F., Sheridan, J., Farley, A., Wilson, L., ..., Blackburn,
687 C.C., 2004. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic
688 epithelium. *Nature immunology*, 5(5), 546-553. <https://doi.org/10.1038/ni1064>

689 Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Haussler, C.A., Hsieh, J.C., Thompson, P.D., Selznick,
690 S.H., Dominguez, C.E., Jurutka, P.W., 1998. The nuclear vitamin D receptor: biological
691 and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.* 13, 325–349.
692 <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.3.325>

693 He, S., Ding, M., Watson Ray, G., Yang, Q., Tan, B., Dong, X., ..., Zhang, S., 2021. Effect
694 of dietary vitamin D levels on growth, serum biochemical parameters, lipid metabolism
695 enzyme activities, fatty acid synthase and hepatic lipase mRNA expression for orange-
696 spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in growth mid-stage. *Aquaculture*
697 *Nutrition*, 27(3), 655-665. <https://doi.org/10.1111/anu.13212>

698 Henry, H.L., Norman, A.W., 1974. Estudos sobre o metabolismo do calciferol: IX. 25-
699 hidroxí-vitamina D3-1-hidroxilase renal. Envolvimento do citocromo P-450 e outras
700 propriedades. *Journal of Biological Chemistry*, 249 (23), 7529-7535.
701 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81270-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81270-X)

702 Heppell, J., Davis, H.L., 2000. Application of DNA vaccine technology to
703 aquaculture. *Advanced drug delivery reviews*, 43(1), 29-43.
704 [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00075-2)

705 Hewison, M., 2010. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme.
706 *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 39, 365-379.
707 <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.02.010>

- 708 Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo*
709 *salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166-177. <https://doi.org/10.3390/biom5010166>
- 710 Hussein, S.Y., MA, M., AM, A., 2021. EFFECT OF VITAMIN A AND D3
711 SUPPLEMENTATION ON THE GROWTH PERFORMANCE OF NILE TILAPIA
712 (*OREOCHROMIS NILOTICUS*). *Assiut Veterinary Medical Journal*, 67(169), 152-164.
713 <https://dx.doi.org/10.21608/avmj.2021.188845>
- 714 Jiang, S., 2010. Aquaculture, capture fisheries, and wild fish stocks. *Resource and Energy*
715 *Economics*, 32(1), 65-77. <https://doi.org/10.1016/j.reseneeco.2009.06.002>
- 716 Kernen, L., Rieder, J., Duus, A., Holbech, H., Segner, H., Bailey, C., 2020. Thymus
717 development in the zebrafish (*Danio rerio*) from an ecoimmunology perspective. *Journal*
718 *of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 333(10), 805-
719 819. <https://doi.org/10.1002/jez.2435>
- 720 Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 26,
721 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>
- 722 Kumwan, B., Bunnoy, A., Chatchaiphan, S., Kayansamruaj, P., Dong, H.T., Senapin, S.,
723 Srisapoom, P., 2023. First investigation of the optimal timing of vaccination of Nile
724 tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae against *Streptococcus agalactiae*. *Vaccines*, 11(12),
725 1753. <https://doi.org/10.3390/vaccines11121753>
- 726 Levraud, J.P., Boudinot, P., 2009. The immune system of teleost fish. *Medicine Sciences:*
727 *M/S*, 25(4), 405-411. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009254405>
- 728 Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S.H., Pan, B., Straus, D.L., Steinberg, C.E., 2020.
729 Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish
730 diseases. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 943-965. <https://doi.org/10.1111/raq.12365>
- 731 Lin, H., Ding, M., Ray, G.W., Tan, B., Yang, Q., 2022. Vitamin D promotes growth, feed
732 utilization and gene expression related to lipid metabolism for juvenile orange-spotted
733 grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Reports*, 23, 101074.
734 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101074>

735 Lock, E., Waagbo, R., Wendelaar, B.S., Flik, G., 2010. The significance of vitamin D for
736 fish: a review. *Aquac. Nutr.* 16, 100-116. <https://doi.org/10.1111/j.1365->
737 2095.2009.00722x

738 Luna, L.G., 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute
739 of Pathology.

740 Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish*
741 *immunology*, 20(2), 137-151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>

742 Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I., 2006. Immunology, 7 th Edition (1-552).
743 Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

744 Marsden, M. J., Vaughan, L. M., Foster, T. J., Secombes, C. J., 1996. A live (delta aroA)
745 *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T-cell
746 responses relative to B-cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infection*
747 *and immunity*, 64(9), 3863-3869. <https://doi.org/10.1128/iai.64.9.3863-3869.1996>

748 Mathieu, C., 2011. Vitamin D and the immune system: Getting it right. *IBMS Bonekey*
749 8, 178–186. <https://doi.org/10.1138/20110505>

750 Mok, C.C., 2013. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: an update. *Expert Rev.*
751 *Clin. Immunol.* 9, 453–463. <https://doi.org/10.1586/eci.13.19>

752 Miao, L.H., Xie, J., Ge, X.P., Wang, K.B., Zhu, J., Liu, B., ..., Pan, L.K., 2015. Chronic
753 stress effects of high doses of vitamin D3 on *Megalobrama amblycephala*. *Fish &*
754 *Shellfish Immunology*, 47(1), 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.012>

755 Mulero, I., Sepulcre, M.P., Fuentes, I., García-Alcázar, A., Meseguer, J., García-Ayala,
756 A., Mulero, V., 2008. Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a
757 lack of correlation between lymphocyte development and adaptive
758 immunocompetence. *Molecular immunology*, 45(10), 2981-2989.
759 <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.01.017>

760 Nakanishi, T., Shibasaki, Y., Matsuura, Y., 2015. T cells in fish. *Biology*, 4(4), 640-663.
761 <https://doi.org/10.3390/biology4040640>

762 Ng, W.K., Romano, N., 2013. A review of the nutrition and feeding management of
763 farmed tilapia throughout the culture cycle. *Reviews in Aquaculture*, 5(4), 220-254.
764 <https://doi.org/10.1111/raq.12014>

765 Nielsen, M.E., Esteve-Gassent, M.D., 2006. The eel immune system: present knowledge
766 and the need for research. *Journal of Fish Diseases*, 29(2), 65-78.
767 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00695.x>

768 O'Connell, J.P., Gatlin III, D.M., 1994. Effects of dietary calcium and vitamin D3 on
769 weight gain and mineral composition of the blue tilapia (*Oreochromis aureus*) in low-
770 calcium water. *Aquaculture*, 125(1-2), 107-117. [https://doi.org/10.1016/0044-](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90287-9)
771 [8486\(94\)90287-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90287-9)

772 Olabuenaga, S.E., 2000. SISTEMA INMUNE EN PECES. *Gayana (Concepción)* 64,
773 205–215. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382000000200010>

774 Ostrensky, A., Boeger, W.A., 1998. *Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo*.

775 Ozório, R.O.A., Avnimelech, Y., Castagnolli, N., 2004. Sistemas intensivos fechados de
776 produção de peixes. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*.
777 *São Paulo: TecArt*, 7-24.

778 Peixe Br, 2024. Anuario Brasileiro da Piscicultura Peixe Br 2024.
779 <https://www.peixebr.com.br/anuario-2024/> (Acessado em 02 de julho de 2024).

780 Pierens, S.L., Fraser, D.R., 2015. The origin and metabolism of vitamin D in rainbow
781 trout. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 145, 58-64.
782 <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.005>

783 Popma, T.J., Lovshin, L.L., 1996. Worldwide prospects for commercial production of
784 tilapia.

785 Press, C.M., Evensen, O., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes.
786 *Fish Shellfish Immunol.* 9, 309–318. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>

787 Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and

788 their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunol. Lett.*
789 148, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>

790 Romano, N., Taverne-Thiele, A.J., Fanelli, M., Baldassini, M.R., Abelli, L., Mastrolia, L.,
791 ..., Rombout, J.H., 1999. Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.:
792 developing thymocytes in the epithelial microenvironment. *Developmental &*
793 *Comparative Immunology*, 23(2), 123-137. <https://doi.org/10.1016/S0145->
794 305X(98)00053-6

795 Romano, L. A., 2012. El sistema inmune inespecífico de los peces. *Patología e sanidade*
796 *de organismos aquáticos. ABRAPOA, Rio de Janeiro.*

797 Romano, L.A., Oliveira, F.P.S., Pedrosa, V. F., 2021. Mast cells and eosinophilic granule
798 cells in *Oncorhynchus mykiss*: Are they similar or different?. *Fish and Shellfish*
799 *Immunology Reports*, 2, 100029.

800 Rubio-Godoy, M., 2010. Inmunología de los peces óseos: Revisión. *Revista mexicana de*
801 *ciencias pecuarias*, 1(1), 47-57.

802 Salinas, I., 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology (Basel)*. 4, 525–
803 539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>

804 Secombes, C.J., Ellis, A.E., 2012. The Immunology of Teleosts, in: *Fish Pathology:*
805 *Fourth Edition*. pp. 144–166. <https://doi.org/10.1002/9781118222942.ch4>

806 Shiau, S. Y., Hwang, J. Y., 1993. Vitamin D Requirements of Juvenile Hybrid Tilapia
807 *Oreochromis niloticus** *O. aureus*. *日本水産学会誌*, 59(3), 553-558.
808 <https://doi.org/10.2331/suisan.59.553>

809 Smith, N.C., Rise, M.L., Christian, S.L., 2019. A comparison of the innate and adaptive
810 immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish. *Frontiers in*
811 *immunology*, 10, 2292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>

812 Stoskopf, M.K., 1993. Clinical pathology. in M.K. Stoskopf, editor. *Fish medicine*. W.B.
813 Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA.

814 Sunitarao, D., Raghuramulu, N., 1997. Vitamin D3 in *Tilapia mossambica*: relevance of
815 photochemical synthesis. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 43(4), 425-
816 433. <https://doi.org/10.3177/jnsv.43.425>

817 Thapa, P., Farber, D.L., 2019. The role of the thymus in the immune response. *Thoracic*
818 *surgery clinics*, 29(2), 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.12.001>

819 Trichet, V.V., 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture research*, 41(3),
820 356-372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x>

821 Turvey, S.E., Broide, D.H., 2010. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical*
822 *Immunology*, 125(2), S24-S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>

823 Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchiatti, S.,
824 ..., Bossier, P., 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. *Reviews in*
825 *Aquaculture*, 5, S1-S25. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01082.x>

826 Vasilyevna Belyaeva, I., Pavlovitch Churilov, L., Robertovna Mikhailova, L.,
827 Vladimirovitch Nikolaev, A., Andreevna Starshinova, A., Kazimirovitch Yablonsky, P.,
828 2017. Vitamin D, Cathelicidin, Prolactin, Autoantibodies, and Cytokines in Different
829 Forms of Pulmonary Tuberculosis versus Sarcoidosis. *Isr. Med. Assoc. J.* 19, 499–505.

830 Waldige, V., Caseiro, A., 2004. A indústria de rações: situação atual e
831 perspectivas. *Panorama da Aqüicultura*, 81(14), 27-32.

832 Warr, G.W., 1995. The immunoglobulin genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 1–12.
833 [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(94\)00052-H](https://doi.org/10.1016/0145-305X(94)00052-H)

834 Wang, Y., Liu, J., Xiao, H., Sun, H., Hu, H., Ma, X., ..., Zhou, H., 2024. Dietary intakes
835 of vitamin D promote growth performance and disease resistance in juvenile grass carp
836 (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-15.
837 <https://doi.org/10.1007/s10695-024-01330-9>

838 Waters, W.R., Palmer, M. V, Nonnecke, B.J., Whipple, D.L., Horst, R.L., 2004.
839 *Mycobacterium bovis* infection of vitamin D-deficient NOS2^{-/-} mice. *Microb. Pathog.*
840 36, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2003.08.008>

- 841 Wu, C., Lu, B., Wang, Y., Jin, C., Zhang, Y., Ye, J., 2020. Effects of dietary vitamin D₃
842 on growth performance, antioxidant capacities and innate immune responses in juvenile
843 black carp *Mylopharyngodon piceus*. *Fish physiology and biochemistry*, 46, 2243-2256.
844 <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00876-8>
- 845 Yue, G.H., Lin, H.R., Li, J.L., 2016. Tilapia is the fish for next-generation
846 aquaculture. *International Journal of Marine Science and Ocean Technology*, 3(1), 11-
847 13.
- 848 Yuk, J.-M., Shin, D.-M., Lee, H.-M., Yang, C.-S., Jin, H.S., Kim, K.-K., Lee, Z.-W., Lee,
849 S.-H., Kim, J.-M., Jo, E.-K., 2009. Vitamin D₃ Induces Autophagy in Human
850 Monocytes/Macrophages via Cathelicidin. *Cell Host Microbe* 6, 231–243.
851 <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.08.004>
- 852 Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., Cortés, A., 2006. Ontogeny of
853 the immune system of fish. *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 126-136.
854 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>
- 855 Zhang, Y., Li, C.N., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Kuang, S.Y., ... & Feng, L., 2023.
856 Vitamin D serves as a modulator of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon*
857 *idella*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 565, 739144.
858 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739144>