






Respuesta bioquímica e inmune en tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) con suplementación de quitosano en dieta

Biochemical and immune response in red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) with dietary chitosan supplementation

Resposta bioquímica e imune em tilápia vermelha (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) com suplementação de quitosana na dieta

Yuniel Méndez-Martínez^{1*}, Ginger K. Pacheco-Morales¹,
Karla A. Del Barco-Ibarra¹, Yenny G. Torres-Navarrete¹ y
Martha P. Hernández-Vergara².

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Quevedo, Los Ríos, Ecuador. Correos electrónicos: (YM) ymendezm@uteq.edu.ec, , (GP) ginger.pacheco2014@uteq.edu.ec, , (KD) karla.delbarco2014@uteq.edu.ec, , (YT) ytorres@uteq.edu.ec, ; ²División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Boca del Río, Boca del Río, Veracruz, México. Correos electrónicos: (MH) mphv1@yahoo.com.mx, .

Resumen

El uso de bioestimulantes en dietas para peces es una estrategia prometedora para reducir el uso de antibióticos, potenciar la respuesta bioquímica e inmune, lo cual contribuye a mejorar rendimientos productivos y disminuir las pérdidas económicas. Se evaluó la respuesta bioquímica e inmune en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), con diferentes niveles: 0 (control), 1, 2, 3, 4 y 5 % de quitosano en dieta. Se sembraron 270 animales ($7,53 \pm 0,50$ g de peso inicial), distribuidos en un diseño completamente al azar de 6 tratamientos con 3 réplicas y 45 tilapias.tratamiento¹, en 18 tanques con 90 L de agua en sistema cerrado. Los juveniles se alimentaron durante 55 días con las dietas experimentales y al final del bioensayo se tomaron las muestras de tejidos y plasma sanguíneo. Se encontraron diferencias ($p < 0,05$) en las variables respuestas evaluadas, donde

Recibido: 19-11-2020 • Aceptado: 09-03-2021.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: ymendezm@uteq.edu.ec

el contenido de lípidos, triglicéridos, colesterol, hidratos de carbono y glucosa mostraron mayores niveles ($p < 0,05$) a concentraciones de quitosano más bajas. Sin embargo, para contenidos de proteínas se encontró mejor respuesta ($p < 0,05$) a mayores niveles de quitosano en dieta. Con respecto a la materia seca y ceniza no se encontró diferencias ($p < 0,05$). Mientras que la superóxido dismutasa y los leucocitos se encontraron en mayor concentración ($p < 0,05$) cuando se suplementa con quitosano en un 3 y 4 %. Se concluyó que la respuesta bioquímica e inmune de juveniles de tilapia roja se favoreció con la suplementación de quitosano en dieta. **Palabras claves:** glucosa, inmunoestimulantes, leucocitos, proteínas, superóxido dismutasa, triglicéridos.

Abstract

The use of biostimulants in fish diets is a promising strategy to reduce the use of antibiotics, enhance the biochemical and immune response, which contributes to improving productive yields and reducing economic losses. The biochemical and immune response was evaluated in juvenile red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), with different levels: 0 (control), 1, 2, 3, 4 and 5% chitosan in diet. 270 animals (7.53 ± 0.50 g of initial weight), distributed in a completely randomized design of 6 treatments with 3 replicates and 45 tilapia.treatment⁻¹, were sown in 18 tanks with 90 L of water in a closed system. The juveniles were fed for 55 days with the experimental diets and at the end of the bioassay the tissue and blood plasma samples were taken. Differences were found ($p < 0.05$) in the variables evaluated responses, where the content of lipids, triglycerides, cholesterol, carbohydrates and glucose showed higher levels ($p < 0.05$) at lower chitosan concentrations. However, for protein content, a better response ($p < 0.05$) was found at higher levels of chitosan in the diet. Regarding dry matter and ash, no differences were found ($p < 0.05$). While superoxide dismutase and leukocytes were found in higher concentration ($p < 0.05$) when supplemented with chitosan by 3 and 4%. It was concluded that the juvenile biochemical and immune response of red tilapia was favored with dietary chitosan supplementation.

Keywords: glucose, immunostimulant, leukocytes, protein, superoxide dismutase, triglycerides.

Resumo

O uso de bioestimulantes na dieta de peixes é uma estratégia promissora para reduzir o uso de antibióticos, potencializar a resposta bioquímica e imunológica, o que contribui para melhorar os rendimentos produtivos e reduzir as perdas econômicas. A resposta bioquímica e imune foi avaliada em juvenis de tilápia vermelha (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), com diferentes níveis: 0 (controle), 1, 2, 3, 4 e 5% de quitosana na dieta. 270 animais ($7,53 \pm 0,50$ g de peso inicial), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado de 6 tratamentos com 3 repetições e 45 tilápias.tratamento⁻¹, foram semeados em 18

tanques com 90 L de água em sistema fechado. Os juvenis foram alimentados por 55 dias com as dietas experimentais e ao final do bioensaio foram coletadas amostras de tecido e plasma sanguíneo. Foram encontradas diferenças ($p < 0,05$) nas variáveis de resposta avaliadas, onde os teores de lipídios, triglicerídeos, colesterol, carboidratos e glicose apresentaram níveis mais elevados ($p < 0,05$) nas menores concentrações de quitosana. No entanto, para o teor de proteína, uma melhor resposta ($p < 0,05$) foi encontrada em níveis mais elevados de quitosana na dieta. Em relação à matéria seca e cinzas, não foram encontradas diferenças ($p < 0,05$). Já a superóxido dismutase e os leucócitos foram encontrados em maior concentração ($p < 0,05$) quando suplementados com quitosana a 3 e 4%. Concluiu-se que a resposta bioquímica e imune juvenil da tilápia vermelha foi favorecida com a suplementação de quitosana na dieta.

Palavras-chave: glicose, imunoestimulante, leucócitos, proteína, superóxido dismutase, triglicerídeos.

Introducción

La acuicultura creció de manera exponencial en los últimos 50 años, partiendo de una producción de menos de 1 millón de toneladas (t) en 1950 a más de 90 millones t a nivel mundial en los últimos años (FAO, 2020). Uno de los principales factores que incide en el éxito de esta industria es la selección de especies con alto potencial productivo, las cuales son ricas en proteínas y variedad de ácidos grasos insaturados (Jim *et al.*, 2017), tal es el caso de la tilapia roja, de la cual existen híbridos como *Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus* (Méndez-Martínez *et al.*, 2019).

En Ecuador, la tilapia roja se introdujo en 1993, y es la segunda especie de importancia en la acuicultura después del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), donde el cultivo comercial nace a partir de la aparición del virus de la mancha blanca que afectó la producción camaronera, dejando infraestructuras disponibles.

Introduction

Aquaculture has grown exponentially in the last 50 years, from a production of less than 1 million tons (t) in 1950 to more than 90 million tons worldwide in recent years (FAO, 2020). One of the main factors that affects the success of this industry is the selection of species with high productive potential, which are rich in proteins and a variety of unsaturated fatty acids (Jim *et al.*, 2017), such is the case of red tilapia, of which there are hybrids such as *Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus* (Méndez-Martínez *et al.*, 2019).

In Ecuador, red tilapia was introduced in 1993, and is the second most important species in aquaculture after white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), where the commercial culture was born from the appearance of the white spot virus that affected production. shrimp farm, leaving infrastructures available.

En la actualidad, la tilapia se cultiva en sistemas intensivos y semintensivos donde los requerimientos nutricionales son satisfechos con dietas artificiales; pero debido a las condiciones de cultivo como las altas densidades de siembra y limitada calidad de agua, promueve que los organismos se encuentran sujetos a estrés constante que se traduce en bajas tasas de crecimiento, ineficiencia alimenticia y bajas supervivencias (Lara-Flores *et al.*, 2003; Al-Sagheer *et al.*, 2018), lo cual a su vez ha provocado brotes de patógenos e infecciones que conllevan daño sustancial al rendimiento (Brum *et al.*, 2017). Se encontró que el estrés oxidativo en los peces puede producir leucopenia y cambios en la fórmula leucocitaria (Biller y Takahashi, 2018), además de efectos en células y tejidos de mutagénesis y carcinogénesis (Malachy *et al.*, 2017).

Entre los factores limitantes de las producciones acuícolas está la carencia de herramientas inmunoterapéuticas profilácticas que reduzcan el efecto de enfermedades en los diferentes cultivos (Kumari y Sahoo, 2006, Brum *et al.*, 2017), que favorezcan no solo las funciones del sistema inmunológico, sino también los factores metabólicos, tasa de crecimiento (Heo *et al.*, 2001; Fadl *et al.*, 2020) y sean amigables con el medio ambiente.

Los inmunoestimulantes pueden activar respuestas inmunes no específicas y/o específicas, donde los mecanismos de defensa incluyen procesos metabólicos antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos cuyas funciones pueden depender de cantidades óptimas

At present, tilapia is cultivated in intensive and semi-intensive systems where nutritional requirements are satisfied with artificial diets; but due to the cultivation conditions such as high planting densities and limited water quality, it promotes that organisms are subject to constant stress that translates into low growth rates, nutritional inefficiency and low survival rates (Lara-Flores *et al.*, 2003; Al-Sagheer *et al.*, 2018), which in turn has caused outbreaks of pathogens and infections that lead to substantial damage to yield (Brum *et al.*, 2017). It was found that oxidative stress in fish can produce leukopenia and changes in the leukocyte formula (Biller and Takahashi, 2018), as well as effects on cells and tissues of mutagenesis and carcinogenesis (Malachy *et al.*, 2017).

Among the limiting factors of aquaculture productions is the lack of prophylactic immunotherapeutic tools that reduce the effect of diseases in different crops (Kumari and Sahoo, 2006, Brum *et al.*, 2017), which favor not only the functions of the immune system, but also metabolic factors, growth rate (Heo *et al.*, 2001; Fadl *et al.*, 2020) and are friendly to the environment.

Immunostimulants can activate non-specific and/or specific immune responses, where defense mechanisms include non-enzymatic and enzymatic antioxidant metabolic processes whose functions may depend on optimal amounts of immunostimulants to express these types of responses against stressful conditions or the presence of pathogens (Mehana *et al.*, 2015;

de inmunoestimulantes para expresar este tipo de respuestas contra condiciones estresantes o presencia de patógenos (Mehana *et al.*, 2015; Abdel-Ghany y Salem, 2019). Además de considerarse una estrategia prometedora para reducir el uso de antibióticos y productos quimioterapéuticos, potenciar la respuesta productiva y disminuir las pérdidas económicas (Lara-Flores *et al.*, 2003; Al-Sagheer *et al.*, 2018).

En este sentido, el quitosano se ha convertido en candidato, dado que es polisacárido alcalino natural (β-1,4-N-acetilglucosamina) con cargas positivas más abundantes (Alishahi and Aider, 2012; Ngo y Kim, 2014; Abdel-Ghany y Salem, 2019); biodegradable no tóxico, que contiene grupos amino e hidroxilo y tiene diversas propiedades: hemostática, antiinflamatorio, actividad antitumoral, actividad antimicrobiana, actividad hipoglucémica e hipo colesterol y un efecto estimulador catabólico y anabólico (Pérez *et al.*, 2014; Mahmoud *et al.*, 2017; Udo *et al.*, 2018).

Se documentó la actividad bioestimuladora del quitosano en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Sakai *et al.*, 1992), dorada (*Sparus aurata*) (Esteban *et al.*, 2001), lubina juvenil (*Dicentrarchus labrax*) (Zaki *et al.*, 2015), *Labeo rohita* (Mastan, 2015), y bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Udo *et al.*, 2018). Sin embargo, el efecto del quitosano en la dieta sobre aspectos bioquímicos e inmunes en tilapia no ha recibido mucha atención. La presente propuesta se desarrolló para evaluar la respuesta bioquímica e inmune en juveniles de tilapia roja

Abdel-Ghany and Salem, 2019). In addition to being considered a promising strategy to reduce the use of antibiotics and chemotherapeutic products, enhance the productive response and reduce economic losses (Lara-Flores *et al.*, 2003; Al-Sagheer *et al.*, 2018).

In this sense, chitosan has become a candidate, since it is a natural alkaline polysaccharide (β-1,4-N-acetylglucosamine) with more abundant positive charges (Alishahi and Aider, 2012; Ngo and Kim, 2014; Abdel-Ghany and Salem, 2019); non-toxic, biodegradable, containing amino and hydroxyl groups and has various properties: hemostatic, anti-inflammatory, antitumor activity, antimicrobial activity, hypoglycemic and hypo-cholesterol activity, and a catabolic and anabolic stimulatory effect (Pérez *et al.*, 2014; Mahmoud *et al.*, 2017; Udo *et al.*, 2018).

The biostimulatory activity of chitosan was documented in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Sakai *et al.*, 1992), sea bream (*Sparus aurata*) (Esteban *et al.*, 2001), juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Zaki *et al.*, 2015), *Labeo rohita* (Mastan, 2015), and African catfish (*Clarias gariepinus*) (Udo *et al.*, 2018). However, the effect of dietary chitosan on biochemical and immune aspects in tilapia has not received much attention. The present proposal was developed to evaluate the biochemical and immune response in juvenile red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), with the supplementation of different levels of chitosan in the diet.

(*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), con la suplementación de diferentes niveles de quitosano en la dieta.

Materiales y métodos

Formulación y elaboración de dietas experimentales

En el presente estudio, todas las dietas (cuadro 1) se formularon (LINDO Systems, Inc. IL, USA), y la suplementación de diferentes niveles de quitosano: 0 (control), 1, 2, 3, 4 y 5 %, para un total de 6 tratamientos. Todos los ingredientes se tamizaron con un tamiz de malla de 250 μm y se pesaron con una balanza digital (0,01 g; PE 3600 Mettler-Toledo, OH, USA). Para cada dieta se mezclaron todos los macroingredientes en una mezcladora industrial (Hobart 20 Qt-A200, OH, USA) hasta obtener una mezcla uniforme. Los microingredientes se mezclaron en un recipiente plástico antes de agregarlos a la mezcla. La lecitina de soja y aceite de pescado se mezclaron hasta obtener una mezcla homogénea y luego se agregó agua con un equivalente al 30 % por peso de los ingredientes. El alimento fue pelletizado con una picadora de carne (Tor-Rey MJ22 JR, N L, MX) para obtener gránulos de 2 mm, que luego se secaron durante 8 h a 45 °C en un horno de flujo de aire (Hafó Serie 1600, Sheldon Manufacturing Cornelius, OR), luego los pellets secos se envasaron en bolsas plásticas y se mantuvieron a -4 °C hasta su uso (Méndez-Martínez *et al.*, 2019, 2021).

Materials and methods

Formulation and elaboration of experimental diets

In the present study, all the diets (Table 1) were formulated (LINDO Systems, Inc. IL, USA), and the supplementation of different levels of chitosan: 0 (control), 1, 2, 3, 4 and 5 %, for a total of 6 treatments. All ingredients were sieved with a 250 μm mesh sieve and weighed with a digital scale (0.01 g; PE 3600 Mettler-Toledo, OH, USA). For each diet, all the macro ingredients were mixed in an industrial mixer (Hobart 20 Qt-A200, OH, USA) until a uniform mixture was obtained. The micro-ingredients were mixed in a plastic container before adding to the mix. The soy lecithin and fish oil were mixed until a homogeneous mixture was obtained and then water was added with an equivalent of 30 % by weight of the ingredients. The food was pelleted with a meat grinder (Tor-Rey MJ22 JR, NL, MX) to obtain 2 mm granules, which were then dried for 8 h at 45 °C in an air flow oven (Hafó 1600 Series, Sheldon Manufacturing Cornelius, OR), then the dry pellets were packed in plastic bags and kept at -4 °C until use (Méndez-Martínez *et al.*, 2019, 2021).

Fish culture conditions

Red tilapia juveniles (7.53 \pm 0.50g) were obtained from the Fish Culture Program and transferred to the Aquaculture Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences (01°03'18"S, 79°25'24"W) of the Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), respectively. For a

Cuadro 1. Formulación y composición química de dietas experimentales con suplementación de quitosano.

Table 1. Formulation and chemical composition of experimental diets with chitosan supplementation.

Ingredientes	Niveles de quitosano en dietas (%)					
	0	1	2	3	4	5
Harina de pescado ¹	46,50	46,50	46,50	46,50	46,50	47,00
Pasta de soya ²	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00
Harina de trigo ³	13,90	13,90	13,90	13,40	12,90	11,90
Harina de maíz ³	4,00	3,00	2,00	1,50	1,00	0,50
Quitosano ⁴	0,00	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
Lecitina de Soya ³	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Aceite de pescado ⁵	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Alginato de sodio ⁶	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Premezclas minerales ^{3*}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Premezclas vitamínicas ^{3**}	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vitamina C ³	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Composición proximal real (% Materia Seca)						
Materia seca	94,68	93,77	94,02	94,28	93,80	93,99
Ceniza	8,20	9,30	10,10	10,22	12,01	9,80
Grasa	7,15	7,24	8,01	7,84	7,18	8,02
Proteína	32,07	32,22	32,47	32,30	32,22	32,17
Fibra	5,63	5,86	5,92	6,18	6,66	6,81
E. L. N. N [†]	18,38	18,18	18,22	18,11	17,57	18,10
Energía bruta (kJ.g ⁻¹) [‡]	46,95	45,38	43,50	43,46	41,93	43,20

¹Comercial El Gordillo, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. ² Valencia- Avícola, Valencia, Ecuador. ³Supermaxi, Quevedo, Ecuador, ⁴Exspectrocrom, Guayaquil, Ecuador. ⁵ Productos Pesqueros S.A, Manta, Ecuador. ⁶ Suministros AZ, La Paz, México. *mg.kg⁻¹: Sulfato de magnesio 5,1; Cloruro de sodio 2,4; Cloruro de potasio 2; Sulfato ferroso 1; Sulfato de zinc 0,2; Sulfato cúprico 0,0314; Sulfato manganoso 0,1015; Sulfato de cobalto 0,0191; Yodato de calcio 0,0118; Cloruro de cloro 0,051. **mg.kg⁻¹: Tiamina 60; Rivo flavina 25; Niacina 40; Vitamina B6 50; Ácido pantoténico 75; Biotina 1; Folato 10; Vitamina B12 0,2; Hill 600; Myoinositol 400; Vitamina C 200; Vitamina A 5000 UI; Vitamina E 100; Vitamina D 0,1; Vitamina K 5. [†]Extracto libre de nitrógeno = 100 - (% proteína bruta +% extracto etéreo +% fibra bruta +% ceniza). [‡]Se calculó con los coeficientes calóricos: 23,4 kJ.g⁻¹, 39,2 kJ.g⁻¹, 17,2 kJ.g⁻¹ de proteína, grasas y carbohidratos, respectivamente (Goddard, 1996).

¹Comercial El Gordillo, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. ²Valencia- Avícola, Valencia, Ecuador. ³Supermaxi, Quevedo, Ecuador, ⁴Exspectrocrom, Guayaquil, Ecuador. ⁵Productos Pesqueros S.A, Manta, Ecuador. ⁶Suministros AZ, La Paz, México. *mg.kg⁻¹: Magnesium sulfate 5.1; Sodium chloride 2.4; Potassium chloride 2; Ferrous sulfate 1; Zinc sulfate 0.2; Cupric sulfate 0.0314; Manganous sulfate 0.1015; Cobalt sulfate 0.0191; Calcium iodate 0,0118; Chlorine chloride 0.051. **mg.kg⁻¹: Thiamine 60; Rivo flavin 25; Niacin 40; Vitamin B6 50; Pantothenic acid 75; Biotin 1; Folate 10; Vitamin B12 0,2; Hill 600; Myoinositol 400; Vitamin A 5000 UI; Vitamin E 100; Vitamin D 0,1; Vitamin K 5. [†]Nitrogen-free extract = 100 - (% crude protein +% ethereal extract +% crude fiber +% ash). [‡]It was calculated with the caloric coefficients: 23,4 kJ.g⁻¹, 39,2 kJ.g⁻¹, 17,2 kJ.g⁻¹ of protein, fat and carbohydrates, respectively (Goddard, 1996).

Condiciones de cultivo de los peces

Los juveniles de tilapia roja ($7,53 \pm 0,50$ g) se obtuvieron del Programa de Cultivo de Peces y se trasladaron al Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Ciencias Agropecuarias ($01^{\circ}03'18''S, 79^{\circ}25'24''W$) de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), respectivamente. Durante una semana se aclimataron y desparasitaron (API Stress Zyme, OH, USA). Los organismos se colocaron aleatoriamente en 18 tanques a una densidad de 15 peces/tanque de 90 L agua, para un total de 270 peces. Se alimentaron con las seis dietas experimentales, *ad libitum* durante 55 días.

Se realizó el control de los parámetros físico-químicos del agua, la temperatura se midió con un termómetro de mercurio (0 a 50 °C), el oxígeno disuelto con un oxímetro digital (55-DO, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA), y el pH, NH_4 , NO_2 y NO_3 con el kit colorimétrico (Saltwater Master Test, OH, USA), respectivamente. Todos los tanques se sifonearon diariamente en las mañanas antes de alimentar, para retirar las heces y alimento sobrante y el agua (30% aproximadamente) que se extraía durante el sifoneo era reemplazada.

Obtención de muestras: sangre y tejido muscular

Al final del periodo de cultivo se dejaron en ayuno 14 h antes de tomar las muestras, para ello los juveniles se anestesiaron con una solución de eugenol: alcohol (relación 1:3 mL en 10 L de agua), durante 2 min. Las

week they acclimatized and dewormed (API Stress Zyme, OH, USA). The organisms were randomly placed in 18 tanks at a density of 15 fish/90 L water tank, for a total of 270 fish. They were fed the six experimental diets *ad libitum* for 55 days.

The control of the physical-chemical parameters of the water was carried out, the temperature was measured with a mercury thermometer (0 to 50 °C), the dissolved oxygen with a digital oximeter (55-DO, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA), and the pH, NH_4 , NO_2 and NO_3 with the colorimetric kit (Saltwater Master Test, OH, USA), respectively. All tanks were siphoned daily in the morning before feeding, to remove the feces and excess food and the water (approximately 30 %) that was extracted during the siphoning was replaced.

Sampling: blood and muscle tissue

At the end of the culture period, they were fasted for 14 h before taking the samples, for this the juveniles were anesthetized with a eugenol:alcohol solution (ratio 1:3 mL in 10 L of water), for 2 min. Blood samples were obtained as indicated by Azizoglu and Cengizler (1996), by caudal venipuncture with 3 mL disposable syringes and deposited in vacutainer tubes (Vacuette, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE) and capillary tubes (Isolab, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE) with heparinized inner surfaces, and they were kept refrigerated at 4 °C for 24 h. They were then centrifuged (Gemmy, PLC-05, Taipei, TW) at 1200 rpm for 10 min to separate the plasma

muestras de sangre se obtuvieron según lo indicado por Azizoglu y Cengizler (1996), por venopunción caudal con jeringas desechables de 3 mL y depositada en tubos vacuénier (Vacuette, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE) y tubos capilares (Isolab, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE) con superficie interior heparinizados, y se conservaron en refrigeración a 4 °C por 24 h. Luego se centrifugaron (Gemmy, PLC-05, Taipei, TW) a 1200 rpm durante 10 min para separar el plasma de los elementos formes. El tejido muscular se disectó y conservó en bolsas de plástico por separado y se almacenaron a -40 °C hasta su análisis químico (Azaza *et al.*, 2009). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Indicadores evaluados

Para el análisis de composición química (materia seca, proteínas, lípidos, carbohidratos y ceniza) del tejido muscular y las dietas se utilizaron los métodos descritos por la AOAC (2019). La evaluación de glucosa (Trinder, 1969), colesterol y triglicéridos (Schettler y Nussel, 1975) en plasma fue con reactivos kit (Human liquicolor, Wiesbaden, DE) para cada variable respectivamente. Luego se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 25 min en baño María. Las reacciones colorimétricas cambiaron de acuerdo a la variable, para colesterol y triglicéridos fueron pruebas con factor aclarante de lípidos y para glucosa fue a través del método de desproteinización. Luego se llevaron al espectrofotómetro (SunostIk, SBA-733 Plus, Kunshan Road, CHN) para determinar la lectura de absorbancia a 500 nm, respectivamente.

from the formed elements. Muscle tissue was dissected and preserved in separate plastic bags and stored at -40 °C until chemical analysis (Azaza *et al.*, 2009). All analyzes were carried out in triplicate.

Evaluated indicators

For the analysis of chemical composition (dry matter, proteins, lipids, carbohydrates and ash) of muscle tissue and diets, the methods described by the AOAC (2019) were used. The evaluation of glucose (Trinder, 1969), cholesterol and triglycerides (Schettler and Nussel, 1975) in plasma was with kit reagents (Human liquicolor, Wiesbaden, DE) for each variable respectively. Then they were incubated at a temperature of 37 °C for 25 min in a water bath. The colorimetric reactions changed according to the variable, for cholesterol and triglycerides they were tests with lipid lightening factor and for glucose it was through the deproteinization method. They were then taken to the spectrophotometer (SunostIk, SBA-733 Plus, Kunshan Road, CHN) to determine the absorbance reading at 500 nm, respectively.

To determine the enzyme superoxide dismutase, the erythrocytes were washed 4 times with 3.0 mL of 0.9% NaCl solution, centrifuging for 10 min at 3000 rpm after each wash. A Kit (Ransel, Randox, Crumlin, Antrim, UK) was used, based on the methodology of McCord and Fridovich (1969), with a principle in the oxidation of glutathione (GSH) by cumene hydroperoxide catalyzed by GPx; in the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH; the

Para determinar la enzima superóxido dismutasa se lavaron los eritrocitos 4 veces con 3,0 mL de solución de NaCl al 0,9 %, centrifugando durante 10 min a 3000 rpm después de cada lavado. Se empleó un Kit (Ransel, Randox, Cruclin, Antrim, UK), basado en metodología de McCord y Fridovich (1969), con principio en la oxidación de glutatión (GSH) por el hidroperóxido de cumeno catalizado por la GPx; en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH; la lectura de absorbancia se realizó a 340nm. Se realizó el recuento total de leucocitos en cámara de Neubauer de 0,0025 mm² (Optic Labor, DE) (Hrubec y Smith, 2010).

Análisis estadísticos

A los datos se aplicaron las pruebas de Kolmogorov - Smirnov (P<0,05) y Bartlett (P<0,05) previamente al análisis de varianza (ANOVA), cuando se observó valores significativos de F, se utilizó la prueba de rangos múltiples de LSD de Fisher (P<0,05). Se aplicó el software Minitab 18 (Minitab Inc., Philadelphia, PA, USA). Todos los datos porcentuales se transformaron por medio de log₁₀ para normalizar su distribución, antes de los estadísticos.

Resultados y discusión

Los parámetros de calidad del agua fueron los siguientes: temperatura entre 25,0 – 26,0 °C, O₂ de 4,06 – 5,0 mg.L⁻¹, pH de 7 – 8, NH₄ de 0,05 – 0,08 mg.L⁻¹, NO₂ de 0,50 – 1,0 mg.L⁻¹ y NO₃ de 20 – 40 mg.L⁻¹. Estos valores se encuentran dentro de los

absorbance reading was made at 340 um. The total leukocyte count was performed in a Neubauer chamber of 0.0025 mm² (Optic Labor, DE) (Hrubec and Smith, 2010).

Statistical analysis

The Kolmogorov - Smirnov (P <0.05) and Bartlett (P <0.05) tests were applied to the data prior to the analysis of variance (ANOVA), when significant values of F were observed, the rank test was used Fisher's LSD multiples (P <0.05). Minitab 18 software (Minitab Inc., Philadelphia, PA, USA) was applied. All percentage data were transformed by means of log₁₀ to normalize their distribution, before the statistics.

Results and discussion

The water quality parameters were the following: temperature between 25.0 - 26.0 °C, O₂ of 4.06 - 5.0 mg.L⁻¹, pH of 7 - 8, NH₄ of 0.05 - 0.08 mg.L⁻¹, NO₂ from 0.50 - 1.0 mg.L⁻¹ and NO₃ from 20 - 40 mg.L⁻¹. These values are within the regular limits for production under controlled conditions of tilapia (Azaza *et al.*, 2009; Méndez-Martínez *et al.*, 2019), so it is assumed that the variations in the results were due to the treatments.

Muscle tissue protein showed the highest values (75.77, 71.42 and 74.50 % protein), (p <0.05) when they were fed diets containing chitosan levels of 2, 4 and 5 %, respectively. In this sense, Fadl *et al.* (2020), found an increase in protein in Nile tilapia with chitosan supplementation (5 %) in the

límites regulares para producción en condiciones controladas de tilapia (Azaza *et al.*, 2009; Méndez-Martínez *et al.*, 2019), por lo que se supone que las variaciones en los resultados se debieron a los tratamientos.

En el cuadro 2, se muestra la composición química del tejido muscular, la cual difirió significativamente ($p < 0,05$) entre los tratamientos para proteína, hidratos de carbono y lípidos. Por otro lado, para materia seca y cenizas que resultaron similares, aunque los valores más bajos se encontraron en el tratamiento control.

diet and associated it with high serum proteins (albumin and globulin). Proteins, both cellular and plasma, are part of a general deposit of products in circulation for the maintenance of the physiological processes of the organism.

The highest content of carbohydrates in muscle tissue was found with chitosan levels of 0 and 1 %, which corresponded to the glucose levels (table 3) that decreased ($p < 0.05$) to higher levels of chitosan, which is a sensitive indicator to physiological changes and immune response capacity. Low

Cuadro 2. Composición química del músculo en juveniles de tilapia roja en base seca con suplementación de quitosano en dieta.

Table 2. Chemical composition of muscle in red tilapia juveniles on a dry basis with dietary chitosan supplementation.

Variables (%)	Niveles de Quitosano en Dietas (%)						EE	p
	0	1	2	3	4	5		
Materia Seca	17,79	18,82	18,84	21,26	20,01	20,86	0,730	0,078
Proteínas	55,77c	42,92d	75,77a	70,58b	71,42ab	74,50a	4,688	0,002
Lípidos	5,08ab	4,43b	6,72a	4,34b	3,51c	3,71c	1,073	0,014
Hidratos de Carbono	35,02a	47,12a	14,01b	18,83c	17,87c	17,42c	3,771	0,001
Ceniza	4,14	5,78	4,92	5,81	5,09	5,10	0,324	0,536

abcd Letras diferentes dentro de la misma fila, difieren para $p < 0,05$. EE: Error Estándar.

a, b, c, d Different letters within the same row, differ for $p < 0.05$. EE: Standard Error.

La proteína del tejido muscular mostró los valores más altos (75,77, 71,42 y 74,50 % de proteína), ($p < 0,05$) cuando se alimentaron con dietas que contenían niveles de quitosano de 2, 4 y 5%, respectivamente. En este sentido Fadl *et al.* (2020), encontraron aumento de proteína en la tilapia del Nilo con la suplementación de

plasma glucose levels may indicate low stress and better metabolic efficiency (Li *et al.*, 2018). It should be noted that it was not determined in this work if the increase in carbohydrates is structural or energetic, since the method to determine them did not allow to establish this difference.

quitosano (5%) en la dieta y lo asocio con proteínas séricas altas (albumina y globulina). Las proteínas, tanto celulares, como plasmáticas son parte de un depósito general de productos en circulación para mantenimiento de los procesos fisiológicos del organismo.

El mayor contenido de hidratos de carbonos en tejido muscular se encontraron con niveles de quitosano de 0 y 1%, lo cual se correspondió con los niveles de glucosa (cuadro 3) que disminuyó ($p < 0,05$) a niveles superiores de quitosano, la cual es un indicador sensible a cambios fisiológicos y capacidad de respuesta inmune. Los bajos niveles de glucosa en plasma pueden indicar bajo estrés y mejor eficiencia metabólica (Li *et al.*, 2018). Cabe destacar que no se determinó en este trabajo si el aumento de carbohidratos es estructural o energético, ya que el método para determinarlos no permitió establecer esta diferencia.

La adición de diferentes concentraciones de quitosano, especialmente 4 y 5 %, disminuyó ($p < 0,05$) el contenido de lípidos en el músculo de la tilapia (cuadro 2), y las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos (cuadro 3). En este sentido, Miao *et al.* (2020), expresan que el quitosano regula el metabolismo de las grasas, ácidos grasos y Esto podría atribuirse al efecto que ejerce el biopolímero quitosano sobre la utilización eficiente de los nutrientes estimulando el metabolismo de los lípidos. El quitosano puede quelar los iones metálicos o eliminar los radicales libres mediante la donación de hidrógeno o un par de electrones (Ngo

The addition of different concentrations of chitosan, especially 4 and 5 %, decreased ($p < 0.05$) the lipid content in tilapia muscle (Table 2), and the serum concentrations of cholesterol and triglycerides (Table 3). In this sense, Miao *et al.* (2020), state that chitosan regulates the metabolism of fats, fatty acids and this could be attributed to the effect exerted by the chitosan biopolymer on the efficient use of nutrients by stimulating lipid metabolism. Chitosan can chelate metal ions or scavenge free radicals by donating hydrogen or an electron pair (Ngo and Kim, 2014), where an increase in superoxide dismutase activity may be as a consequence of a response to changes in the lipid composition of leukocyte cell membranes, which interfere with the production of cell activating factors (cytokines or chaperonins) that improve or decrease phagocytic capacity (Billar and Takahashi, 2018).

The activity of the enzyme superoxide dismutase (figure 1) was influenced ($p < 0.05$) by the levels of chitosan 3 and 4 % in the diet, reaching values of 187.16 and 181.56 U.mL⁻¹ of blood, respectively. Soberanes-Yepiz *et al.* (2018), suggest that higher antioxidant values are a consequence of multiple oxidative reactions, therefore, this could indicate that it is the site of the highest production of free radicals. Kim and Thomas (2007), found that diets supplemented with chitosan for Atlantic salmon (*Salmo salar*) showed antioxidant activities and a reduction in lipid oxidation in terms of prevention of oxidative stress.

y Kim, 2014), donde un aumento de la actividad de superóxido dismutasa puede ser como consecuencia de una respuesta a cambios en la composición lipídica de las membranas celulares de los leucocitos, que interfieren con la producción de factores activadores de células (citocinas o chaperoninas) que mejoran o disminuyen la capacidad fagocítica (Billar y Takahashi, 2018).

The mechanism of action of the immunostimulating effect of chitosan within the body of the fish is not yet fully understood. Non-specific cellular immunity is known to comprise three defensive mechanisms: inflammation, phagocytosis, and non-specific cytotoxicity. It was observed that inflammation involves leukocytes and follows exposure to an antigenic

Cuadro 3. Bioquímica plasmática en juveniles de tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.

Table 3. Plasma biochemistry in juvenile red tilapia with dietary chitosan supplementation.

Variables (mg.dL ⁻¹)	Niveles de Quitosano en Dietas (%)						EE	p
	0	1	2	3	4	5		
Glucosa	57,33a	53,67a	58,33a	39,67b	36,33b	43,67b	2.591	0,014
Colesterol	140,67b	163,00a	156,67ab	110,33c	130,00c	134,33bc	8.221	0,019
Triglicéridos	159,67ab	199,67a	123,67b	72,33c	103,00c	91,00c	10.326	0,000

^{a, b, c, d} Letras diferentes dentro de la misma fila, difieren para p <0.05. EE: Error Estándar.

^{a, b, c, d} Different letters within the same row, differ for p <0.05. EE: Standard Error.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (figura 1) se vio influenciada (p<0,05) por los niveles de quitosano 3 y 4 % en la dieta alcanzando valores de 187,16 y 181,56 U.mL⁻¹ de sangre, respectivamente. Soberanes-Yepiz *et al.* (2018), sugieren que mayores valores de antioxidantes son consecuencia de múltiples reacciones oxidativas, por tanto, esto pudiera indicar ser el sitio de mayor producción de radicales libres. Kim y Thomas (2007), encontraron que las dietas suplementadas con quitosano para el salmón Atlántico (*Salmo salar*) mostraron actividades antioxidantes

challenge, after contact with the antigen, the affected area receives greater blood supply, followed by an increase in capillary permeability and migration of leukocytes from the blood into the tissue (Szwejsjer *et al.*, 2017), and although they only constitute about 1 % in the blood, they are involved in various allergic reactions and contribute to the repair of damaged tissue, as well as the elimination of tumor cells (Nakanishi *et al.*, 2015).

A significant leukocyte response (figure 2) was observed in fish fed chitosan in a dose-dependent

y una reducción de la oxidación de lípidos en términos de prevención del estrés oxidativo.

manner, which may be related to hematopoiesis involving the production of leukocyte cells mainly

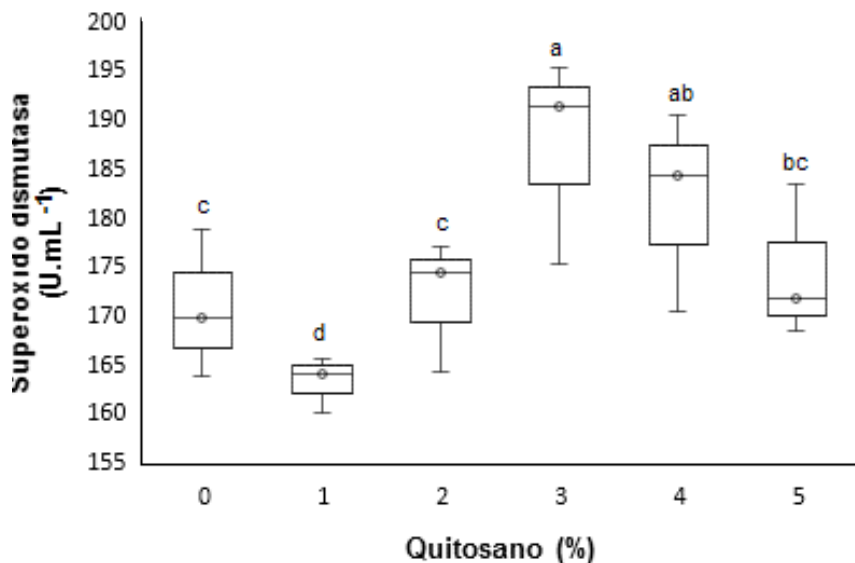


Figura 1. Actividad de superóxido dismutasa ($p=0,0041$), en tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.

Figure 1. Superoxide dismutase activity ($p = 0.0041$), in red tilapia with dietary chitosan supplementation.

El mecanismo de acción del efecto de inmunoestimulación del quitosano dentro del cuerpo del pez aún no se comprende completamente. Se conoce que la inmunidad celular no específica comprende tres mecanismos defensivos: la inflamación, la fagocitosis y la citotoxicidad no específica. Se observó que la inflamación involucra a los leucocitos y sigue a la exposición a un desafío antigénico, posteriormente al contacto con el antígeno, el área afectada recibe mayor irrigación sanguínea, seguida de un aumento en

in the head kidney in the case of teleost fish (Press and Evensen, 1999; Zapata *et al.*, 1996). Hematopoietic stem cells are located in this organ, which is why they have an extensive network to trap particles carried in the blood (Hanington *et al.*, 2009), given that larger populations of macrophages and lymphocytes are located in the kidney and spleen capable of initiating an immune response (Press and Evensen, 1999).

This suggests that the level of chitosan in the diet was able to

la permeabilidad capilar y la migración de los leucocitos de la sangre hacia el tejido (Szwejsjer *et al.*, 2017), y aunque solo constituyen alrededor del 1 % en la sangre, están implicados en diversas reacciones alérgicas y contribuyen a la reparación del tejido dañado, así como a la eliminación de células tumorales (Nakanishi *et al.*, 2015).

Se observó una respuesta significativa de leucocitos (figura 2) en peces alimentados con quitosano de manera dependiente de la dosis, lo cual se puede relacionar con la hematopoyesis que implica la producción de células leucocitarias principalmente en el riñón cefálico en el caso los peces teleósteos (Press y Evensen, 1999; Zapata *et al.*, 1996). En este órgano se localizan las células madre hematopoyéticas, por lo que tienen una extensa red para atrapar partículas acarreadas en la sangre (Hanington *et al.*, 2009), dado a que en el riñón y el bazo se localizan mayores poblaciones de macrófagos y linfocitos capaces de iniciar una respuesta inmune (Press y Evensen, 1999).

Esto sugiere que el nivel de quitosano en dieta pudo estimular el microambiente donde se desarrollan las células hematopoyéticas y factores y proteínas de crecimiento intracelulares. En este sentido, se reportó que la proteína alfa de unión al potenciador CCAAT (C/EBP α), es requerida para el desarrollo de granulocitos, pero también promueve la diferenciación de células madres hematopoyéticas, sin embargo, cuando es deficiente C/EBP α , se bloquea la diferenciación hacia el

stimulate the microenvironment where hematopoietic cells and intracellular growth factors and proteins develop. In this sense, it was reported that the alpha protein binding to the enhancer CCAAT (C/EBP α) is required for the development of granulocytes, but it also promotes the differentiation of hematopoietic stem cells, however, when C/EBP α is deficient, it blocks differentiation towards the myeloid lineage (Zhang *et al.*, 2004). Dietary supplementation with chitosan stimulated immunological parameters by increasing antioxidant activity and leukocyte content.

Conclusion

The biochemical and immune response in juvenile red tilapia (*Oreochromis mossambicus* \times *O. niloticus*) was favored with dietary chitosan supplementation.

Acknowledgment

The research was supported by the Universidad Técnica Estatal de Quevedo and the Projects: FOCYCYT-7ma/PFOC7-48-2020 and EMBLEMÁTICOS/PEMBL-003-2018. Our gratitude for the technical assistance to Ing. Lourdes Ramos, Ing. Tania Leones, and Lic. Wendy Hidalgo.

End of English Version

linaje mieloide (Zhang *et al.*, 2004). La suplementación dietética con quitosano estimuló parámetros

inmunológicos al incrementar la actividad antioxidante y contenido de leucocitos.

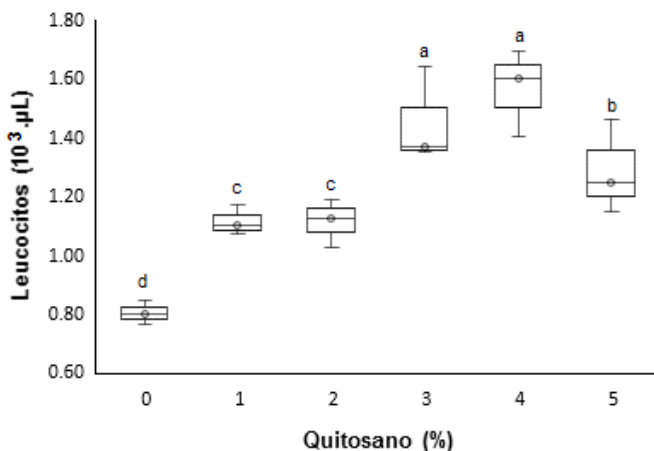


Figura 2. Contenido de Leucocitos ($p=0,010$), en tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.

Figure 2. Leukocyte content ($p=0.010$), in red tilapia with dietary chitosan supplementation.

Conclusión

La respuesta bioquímica e inmune en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) se favoreció con suplementación de quitosano en dieta.

Proyectos: FOCYCYT-7ma/PFOC7-48-2020 y EMBLEMÁTICOS/PEMBL-003-2018. Nuestro agradecimiento por la asistencia técnica a Ing. Lourdes Ramos, Ing. Tania Leones, y Lic. Wendy Hidalgo.

Agradecimientos

La investigación estuvo respaldada por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y los

Literatura citada

Abdel-Ghany, H. M. and M. E. S. Salem. 2019. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. *Rev. Aquacult.* 12(1): 438-

452. <https://doi.org/10.1111/raq.12326>
- Alishahi, A. and M. Aïder. 2012. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: a review. Food Bioproc Tech. 5(3): 817-830. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0664-x>
- Al-Sagheer, A., H. Mahmoud, F. Reda, S. Mahgoub and M. Ayyat. 2018. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. Aquacult. Nutr. 24: 1006-1014. <https://doi.org/10.1111/anu.12637>
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International, 21st Edition. Gaithersburg, Maryland, USA. <https://www.aoc.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- Azaza, M. S., K. Wassim, F. Mensi, A. Abdelmouleh, B. Brini and M. M. Kraïem. 2009. Evaluation of faba beans (*Vicia faba* L. var. *minuta*) as a replacement for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 287: 174-179. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.007
- Azizoglu, A. and I. Cengizler. 1996. An investigation on determination of some hematologic parameters in healthy *Oreochromis niloticus* (L.). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 20: 425-431.
- Biller, J. D. and L. S. Takahashi. 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. An. Acad. Bras. Ciênc. 90 (4): 3403-3914. <https://doi:10.1590/0001-3765201820170730>.
- Brum, A., S. A. Pereira, M. S. Owatari, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves, J. L. P. Mourão and M. L. Martins. 2017. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 468: 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>
- Esteban, M. A., A. Cuesta, J. Ortuno and J. Meseguer. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Fish Shellfish Immunol. 11: 303-315. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0315>
- Fadl, S.E., G. A. El-Gammal, W.S. Abdo, M. Barakat, O. A. Sakr, E. Nassef, D. M. Gad and H. S. El-Sheshtawy, 2020. Evaluation of dietary chitosan effects on growth performance, immunity, body composition and histopathology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as well as the resistance to *Streptococcus agalactiae* infection. Aquac. Res. 51: 1120-1132. <https://doi.org/10.1111/are.14458>
- FAO. 2020. FishStatJa tool for fishery statistics analysis, Release 2.0.0. Universal software for fishery statistical time series. Global capture and aquaculture production: Quantities 1950-2018; Aquaculture values 1984-2018. Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. Rome. <http://www.fao.org/fishery/>
- Goddard, S. 1996. Feeding and diet. p.23-33. In: Chapman and Hall (Eds). Feed Management in Intensive Aquaculture. New York, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1173-7_2
- Hanington, P. C., J. Tam, B. A. Katzenback, S. J. Hitchen, D. R. Barreda and M. Belosevic. 2009. Development of macrophages of cyprinid fish. Dev. Comp. Immunol. 33: 411-429. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.11.004>
- Heo, G. J., J. H. Kim, B. G. Jeon and K. Y. R. J. Park. 2001. Effects of FST-chitosan mixture on cultured rockfish (*Sebastes schlegelii*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Korean J. Vet. Public. Heal. 25(3): 141-149.
- Hrubec, T. and S. Smith. 2010. Hematology of Fishes. p. 994-1003. In: Weiss, D. J., Wardrop, K. J. and O. W. Schalm's (Eds). Veterinary Hematology, 6ta

Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. <https://www.worldcat.org/title/schalms-veterinary-hematology/oclc/338288636>

- Jim, F., P. Garamumhango and C. Musara. 2017. Comparative analysis of nutritional value of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), Nile Tilapia, Meat from three different ecosystems. *J. Food Qual.* <https://doi.org/10.1155/2017/6714347>
- Kim, K. W. and R. L. Thomas. 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chem.* 101: 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.038>
- Kumari, J. and P. K. Sahoo. 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquac. Res.* 37(5): 500-509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01456.x>
- Lara-Flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzmán-Méndez and W. López-Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216(4): 193-201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6)
- Li, S., C. Sang, J. Zhang, N. Chen, Z. Li, P. Jin and X. Huang. 2018. Effects of acute hyperglycemia stress on plasma glucose, glycogen content, and expressions of glycogen synthase and phosphorylase in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). *Fish. Physiol. Biochem.* 44: 1185-1196. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0508-y>
- Mahmoud, H. K., A. A. Al-Sagheer, F. M. Reda, S. A. Mahgoub and M. S. Ayyat. 2017. Dietary curcumin supplement influence on growth, immunity, antioxidant status, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 475: 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.043>
- Malachy, N. O. A., K. P. Pramod, K. Kumar and P. Nalini. 2017. Assessment of mutagenic, hematological and oxidative stress biomarkers in liver of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in response to sublethal verapamil exposure. *Drug Chem. Toxicol.* 40(3): 286-294. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1219914>
- Mastan, S. A. 2015. Use of immunostimulants in aquaculture disease management. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2(4): 277-280. <https://www.fisheriesjournal.com/archives/2015/vol2issue4/PartF/2-4-59.pdf>
- McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Mehana, E. E., H. A. Rahmani and M. S. Aly. 2015. Immunostimulants and Fish Culture: An Overview. *Annu. Res. Rev. Biol.* 5(6): 477-489. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2015/9558>
- Méndez-Martínez, Y., Y. G. Torres-Navarrete, Y. Pérez-Tamames, M. Romás-Viltres, y E. Cortés-Jacinto (2021). Effect of duckweed meal dietary inclusion on growth performance and survival of African catfish fingerlings. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 38(1): 84-104. [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\)](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ))
- Méndez-Martínez, Y., Y. Pérez, D.M. Verdecia, E. Cortés-Jacinto, O.F. Cevallos- Falquez, y O. Romero. 2019. Effect of the inclusion of *Azolla filiculoides* meal on the growth and survival of red tilapia small fish (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*). *Cuba. J. Agric. Sci.* 53: (2): 289-299. <http://scielo.sld.cu/pdf/cjas/v53n3/2019-3480-cjas-53-03-289.pdf>
- Miao, Z., L. Guo, Y. Liu, W. Zhao and J. Zhang. 2020. Effects of dietary supplementation of chitosan on carcass composition and meat quality in growing *Huoyan geese*. *Poult. Sci. J.* 99(6): 3079-3085. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.025>
- Nakanishi, T., Y. Shibasaki, Y. Matsuura. 2015. T Cells in Fish. *Biology.* 4: 640-663. <https://doi.org/10.3390/biology4040640>

- Ngo, D.-H. and S.-K. Kim. 2014. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Adv. Food Nutr. Res.* 73: 15-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>.
- Pérez, R., B. Romeu, M. Lastre, Y. Morales, O. Cabrera, L. Reyes, E. González, S. Sifontes, y O. Pérez. 2014. Inmunopotenciadores para la acuicultura TT-Immunopotentiators for the Aquaculture. *Vaccinmonitor*. 23(1): 24–31. <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v23n1/vac05114.pdf>
- Press, C. M. and O. Evensen. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 309-318. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>
- Sakai, M., H. Kamiya, S. Ishii, S. Atsuta and M. Kobayashi. 1992. The immunostimulating effects on chitin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Asian Aquacult.* 1: 413-417.
- Schettler G. and E. NusselE. 1975. Colorimetric determination of Triglycerides and cholesterol. *Arb. Med. Soz. Med. Prav. Med.* 10: 25.
- Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidaseperoxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Path.* 22(2): 158-161. DOI: 10.1136/jcp.22.2.158
- Soberanes-Yepiz, M. L., Y. Méndez-Martínez, M. U. García-Guerrero, F. Ascencio, J. Violante-González, S. García-Ibañez, y E. Cortés-Jacinto. 2018. Superóxido dismutase activity in tissues of juvenile cauque river prawn (*Macrobrachium americanum* Bate, 1868) fed with different levels of protein and lipid. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 46(3):543–55. <http://doi.org/10.3856/vol46-issue3-fulltext-7>
- Szwejsjer, E., B. M. L. K. Verburg-van, M. Maciuszek, and M. Chadzinska. 2017. Estrogen-dependent seasonal adaptations in the immune response of fish. *Horm. Behav.* 88: 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.007>
- Udo, I. U., U. Etukudo and U. I. U. Anwana. 2018. Effects of chitosan and chitosan nanoparticles on water quality, growth performance, survival rate and meat quality of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Nanoscience.* 1(1): 12-25. <https://doi.org/10.31058/j.nano.2018.11002>
- Zaki, M. A., M. El-S. Salem, M. M. Gaber and A. M. Nour. 2015. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, feed utilization, body composition and histology of seabass (*Dicentrarchus labrax*). *World Journal of Engineering and Technology.* 3: 38-47. <https://doi.org/10.4236/wjet.2015.34C005>
- Zapata, A. G., A. Chibá and A. Varas. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. p. 61-62. In: Iwama, G., and T. Nakanishi (Eds). *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic Press, Ltd., London. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9731677>
- Zhang, P, J. Iwasaki-Arai, H. Iwasaki, M. L. Fenyus, T. Dayaram, and B. M. Owens. 2004. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.* 21(6): 853-863. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.006>