

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/08/2024

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

Simone Andrea de Assis Beneti

Médica Veterinária

**EFEITO DO β -GLUCANO ASSOCIADO AO ESTRESSE DE
MANEJO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA
IMUNE DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dracena

2023

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

Simone Andrea de Assis Beneti

**EFEITO DO β -GLUCANO ASSOCIADO AO ESTRESSE DE
MANEJO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA
IMUNE DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Campus de Dracena como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Jaqueline Dalbello Biller

Dracena

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

B4656e

Beneti, Simone Andrea de Assis.

Efeito do β -Glucano associado ao estresse de manejo sobre a expressão de genes do sistema imune de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Isabela de Almeida Cipriano. -- Dracena: [s.n.], 2023.

126 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2023.

Orientadora: Jaqueline Dalbello Biller

1. Sistema Imune. 2. Estresse. 3. Streptococcus. 4. Expressão Gênica. 5. Tilápia-do-Nilol. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito do β -glucano associado a estresse de manejo, sobre a expressão de genes do sistema imune de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

AUTORA: SIMONE ANDRÉA DE ASSIS BENETI
ORIENTADORA: JAQUELINE DALBELLO BILLER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência e Tecnologia Animal, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Presencial)
Departamento de ZootecniaFCATUNESP / FCAT UNESP Dracena

Dra. MARÍA DEL CAMINO FIERRO CASTRO (Participação Virtual)
Departamento de Biología Molecular, Área de Genética / Facultad de Biología - Universidad de León (Spain)



FIERRO CASTRO
MARIA CAMINO
- 43525649N

Firmado digitalmente
por FIERRO CASTRO
MARIA CAMINO -
43525649N
Fecha: 2023.03.01
13:05:44 +01'00'



Prof. Dr. CELSO TADAO MIASAKI (Participação Presencial)
Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT -
Departamento de Produção Animal - Câmpus de Dracena

Dracena, 28 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Simone Andrea de Assis Beneti, nascida em 24 de setembro de 1965, na cidade de São Vicente/SP. Médica Veterinária, formada pela Universidade Estadual de Londrina, em 10 de agosto de 1992, trabalhando com Clínica Médica de Pequenos Animais desde a formatura até 2019. Fotógrafa Técnica Pericial, no Instituto de Criminalística de Dracena desde 2019.

AGRADECIMENTOS

Os reconhecimentos e agradecimentos são inúmeros num trabalho como esse e peço antecipadamente desculpas se esqueci de citar alguém.

Agradeço à professora Dr.^a Jaqueline por acreditar em meu trabalho e pela grande oportunidade de aprender um pouco de seus conhecimentos.

Agradeço também à equipe do laboratório LIA, pois não poderia ter feito todo esse trabalho sem essa valorosa contribuição, e, em especial à Basia e Ingrid que não pouparam esforços em me ensinar e ajudar nas inúmeras análises.

Agradeço aos professores que contribuíram direta e indiretamente para meu conhecimento e confecção do experimento, como Prof.^a Cláudia Maria Bertan Membrive, Prof. Dr. Gustavo do Valle Polycarpo e Prof. Dr. Celso Tadao Miasaki.

Agradeço também à minha família pelo incentivo, paciência e ajuda durante todo o processo.

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

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeito do B-glucano administrado antes e após estresse de manejo, sobre a imunidade de tilápias, *Oreochromis niloticus*"** (Effect of B-glucan administered before and after management stress, on the immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*), registrada com o nº **07/2020.R2 – CEUA**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Jaqueline Dalbello Biller** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em **25/11/2020**.

Dracena, 25 de novembro de 2020.



Prof. Dr. Danilo Domingues Millen
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

RESUMO

O crescimento da piscicultura brasileira ocasionou o aumento de doenças, e consequentes perdas na produção, por isso diversos estudos têm avaliado o uso de imunoestimulantes para prevenção e controle de doenças. Dentre eles destaca-se o β -glucano, composto mais estudado e utilizado na alimentação de peixes. Há evidências de que a administração do β -glucano pode ativar de forma eficaz, diversos mecanismos de defesa. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos desse imunoestimulante em situação de estresse sobre as respostas imunes inatas de tilápias pela avaliação de variáveis imunológicas, hematológicas e expressão de genes. Um total de 408 tilápias (*Oreochromis niloticus*) foram distribuídas em 24 caixas de polietileno, e divididas randomicamente em oito grupos com 3 repetições cada: C15: Tilápias receberam dieta controle (livre de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 de experimento; C15D: Tilápias receberam dieta controle (livre de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas no 14º dia e foram amostradas aos 15 de experimento; β 15: Tilápias receberam dieta experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 dias; β 15D: Tilápias receberam dieta experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas no 14º dia e foram amostradas aos 15 de experimento; C30: Tilápias receberam dieta controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas aos 30 dias de experimento; C30D: Tilápias receberam dieta controle (livre de β -glucano) por 30 dias, foram desafiadas no 29º dia e foram amostradas aos 30 de experimento; β 30: Tilápias receberam dieta experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas após 30 dias e β 30D: Tilápias receberam dieta experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 30 dias, foram desafiadas no 29º dia e foram amostradas aos 30 de experimento. Nos peixes amostrados aos 15 e 30 dias de experimento, após serem anestesiados, foram aferidos os pesos e comprimentos corporais; foi coletado sangue para avaliação de variáveis imunológicas (atividade da lisozima e atividade hemolítica do complemento); variáveis hematológicas (hemograma, leucograma e índices hematimétricos); avaliação dos variáveis de desempenho produtivo (peso final; ganho de peso; taxa de crescimento específico; conversão alimentar; taxa de eficiência protéica e fator de condição corporal) e análise de expressão dos genes do sistema imune (*tlr1*, *tlr2*, *myd88*, *nfb1*, *tnfa*, *il1 β* , *il6*, *il8*, *il10*, *lys*, *c3*, *igm*, *ifn γ* , *cox2*, *mx* e *hsp70*). A associação de β -glucano e manejos estressantes promoveram modulações imunes indicando que esses compostos podem ser usados para promover defesa precoce e proteger peixes contra doenças.

Palavras-chave: Sistema Imune. Estresse. *Streptococcus sp.*. Expressão Gênica. Tilápia-do-Nilo.

ABSTRACT

The growth of Brazilian fish farming caused an increase in diseases, and consequent losses in production, so several studies have evaluated the use of immunostimulants for disease prevention and control. Among them, β -glucan stands out, the compound most studied and used in fish feeding. There is evidence that the administration of β -glucan can effectively activate several defense mechanisms. Thus, the objective of the present work was to evaluate the effects of this immunostimulant under stress on the innate immune responses of tilapias by evaluating immunological, hematological and gene expression variables. A total of 408 tilapias (*Oreochromis niloticus*) were distributed in 24 polyethylene boxes, and randomly divided into eight groups with 3 replicates each: C15: Tilapias received a control diet (β -glucan free) for 15 days and were sampled after 15 days of experiment; C15D: Tilapias received a control diet (β -glucan free) for 15 days, were challenged on the 14th day and were sampled at the 15th of the experiment; β 15: Tilapias received an experimental diet (1g kg^{-1} of β -glucan) for 15 days and were sampled after 15 days; β 15D: Tilapias received an experimental diet (1g kg^{-1} of β -glucan) for 15 days, were challenged on the 14th day and were sampled on the 15th day of the experiment; C30: Tilapias received a control diet (β -glucan free) for 30 days and were sampled at 30 days of experiment; C30D: Tilapias received a control diet (β -glucan free) for 30 days, were challenged on the 29th day and were sampled at the 30th day of the experiment; β 30: Tilapias received an experimental diet (1g kg^{-1} of β -glucan) for 30 days, were sampled and challenged at 30 days of experiment and β 30D: Tilapias received an experimental diet (1g kg^{-1} of β -glucan) for 30 days, were challenged on the 29th day, and were sampled at the 30th day of the experiment. In fish sampled at 15 and 30 days of experiment, after being anesthetized, body weights and lengths were measured; blood was collected for evaluation of immunological variables (lysozyme activity and complement hemolytic activity); hematological variables (blood count, leukogram and blood counts); evaluation of productive performance variables (final weight; weight gain; specific growth rate; feed conversion; protein efficiency rate and body condition factor) and analysis of immune system genes expression (*tlr1*, *tlr2*, *myd88*, *nfbk1*, *tnfa*, *il1 β* , *il6*, *il8*, *il10*, *lys*, *c3*, *igm*, *ifny*, *cox2*, *mx*, and *hsp70*). The association of β -glucan and stressful management promoted immune modulations indicating that these compounds can be used to promote early defense and protect fish against diseases.

Keywords: Immune System. Stress. *Streptococcus*. Gene Expression, Nile Tilapia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingredientes e formulação das rações da dieta	58
Tabela 2 - Correlação da expressão de genes em rim cranial de tilápias	71
Tabela 3 - Correlação da expressão de genes em baço de tilápias	71
Tabela 4 - Correlação da expressão de genes em rim cranial de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo	99
Tabela 5 - Correlação da expressão de genes em baço de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo	100
Tabela 6 - Parâmetros hematológicos de tilápias alimentadas com β -glucano e desafiadas com manejos estressantes.	119
Tabela 7 - Desempenho zootécnico de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência de primers do capítulo 2	63
Quadro 2 - Sequência de primers do capítulo 3	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de sinalização e funções dos TLRs.....	20
Figura 2 - Análise filogenética de alguns TLRs de vertebrados, baseado na sequência de aminoácidos	21
Figura 3 - Mecanismo celular da ação dos β -D-glucanos	36
Figura 4 - Diluições do meio de cultura de bactérias para a contagem de células....	61
Figura 5 - Expressão relativa do gene <i>tlr1</i> em rim e baço de	65
Figura 6 - Expressão relativa do gene <i>tlr2</i> em rim e baço de	66
Figura 7 - Expressão relativa do gene <i>myd88</i> em rim e baço de	67
Figura 8 - Expressão relativa do gene <i>nfkb1</i> em rim e baço de	68
Figura 10 - Expressão relativa do gene <i>il8</i> em rim e baço de.....	70
Figura 13 - Expressão relativa do gene <i>ifnγ</i> em rim e baço.....	90
Figura 15 - Expressão relativa do gene <i>il10</i> em rim e baço	92
Figura 16 - Expressão relativa do gene <i>lys</i> em rim e baço.....	93
Figura 17 - Expressão relativa do gene <i>c3</i> em rim e baço de	94
Figura 18 - Expressão relativa do <i>cox2</i> em rim e baço de.....	95
Figura 19 - Expressão relativa do gene <i>mx</i> em rim e baço de	96
Figura 20 - Expressão relativa do gene <i>hsp70</i> em rim e baço	98
Figura 21 - Atividade da lisozima em tilápias alimentadas com β -glucano.....	116
Figura 22 - Atividade hemolítica do complemento em tilápias alimentadas com β - glucano.....	117
Figura 23 - Atividade respiratória de leucócitos em tilápias alimentadas com β - glucano.....	117
Figura 24 - Parâmetros hematológicos em tilápias alimentadas com β -glucano.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>c3</i>	<i>componente três do sistema complemento</i>
<i>cox2</i>	<i>citocromo C oxidase 2</i>
DAMP	Padrão Molecular Associado ao Dano
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO	densidade ótica
<i>hsp70</i>	<i>proteína de choque térmico 70</i>
<i>ifny</i>	<i>interferon gama</i>
<i>igm</i>	<i>imunoglobulina m</i>
<i>il10</i>	<i>interleucina 10</i>
<i>il1β</i>	<i>interleucina 1beta</i>
<i>il6</i>	<i>interleucina 6</i>
<i>il8</i>	<i>interleucina 8</i>
<i>lys</i>	<i>lisozima</i>
<i>mx</i>	<i>gene da proteína "Mixovirus resistente"</i>
<i>myd88</i>	<i>Fator de diferenciação mieloide 88</i>
<i>nfbk1</i>	<i>nuclear factor–kappa B</i>
NK	natural killer
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCA	<i>Plate Count Ágar</i>
PRR	receptores de reconhecimento padrão
ROS	espécies reativas de oxigênio
TLR	Toll like receptor (receptores do tipo toll)
<i>tlr1</i>	<i>receptores do tipo toll 1</i>
<i>tlr2</i>	<i>receptores do tipo toll 2</i>
<i>tnfa</i>	<i>fator de necrose tumoral alfa</i>
UFC	Unidade formadora de colônia

Obs.: Neste trabalho utilizamos as regras de nomenclatura de genes e proteínas baseado nas convenções do peixe zebra (ZFIN: Zebrafish Book: Genetic Methods, [S.D.]) da seguinte maneira:

Nomes de genes e suas abreviações são escritos em itálico e com letras minúsculas e
Nomes de proteínas e suas abreviações são escritos em itálico com a primeira letra em maiúsculo e o restante em minúsculo

SUMARIO

1 - CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.2 OBJETIVOS GERAIS	16
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.3.1 Sistema imune dos peixes	17
1.3.2 Genes e proteínas do sistema imune de peixes	18
1.3.3 Tilápia	30
1.3.4 Estresse	32
1.3.5 Patógeno	33
1.3.6 Imunoestimulante.....	34
1.4 REFERÊNCIAS.....	37
2 - CAPÍTULO 2: ADMINISTRAÇÃO DE B -GLUCANO ASSOCIADO AO ESTRESSE ESTIMULA O CAMINHO DE SINALIZAÇÃO TLR – MYD88 – NFK-B1 EM TILÁPIAS DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS).....	53
2.1 INTRODUÇÃO	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.3.1 Animais	56
2.3.2 Dietas.....	57
2.3.3 Delineamento experimental	58
2.3.4 Desafio de estresse e infecção experimental	59
2.3.5 Bacterina para infecção experimental <i>S. agalactiae</i> (inativada).....	60
2.3.6 Análises de biologia molecular- <i>real-time quantitative PCR</i> (qRT-PCR) ...	61
2.3.7 Análises estatísticas	63
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
2.4.1 Expressão relativa do gene <i>receptor toll like 1 (tlr1)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	64
2.4.2 Expressão relativa do gene <i>receptor toll like 2 (tlr2)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	65
2.4.3 Expressão relativa do gene <i>resposta primária de diferenciação mieloide 88 (myd88)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	66
2.4.4 Expressão relativa do gene <i>fator nuclear NF-kappa-B1 (nfkb1)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	67
2.4.5 Expressão relativa do gene <i>fator de necrose tumoral alfa (tnfa)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	68

2.4.6 Expressão relativa do gene <i>interleucina 8 (il8)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	69
2.4.7 Análise de correlação dos genes	71
2.5 CONCLUSÃO	71
2.6 REFERÊNCIAS	73
3 - CAPÍTULO 3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO β-GLUCANO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA DE DEFESA DE TILÁPIAS (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) EM SITUAÇÃO DE ESTRESSE	77
3.1 INTRODUÇÃO	79
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	80
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	81
3.3.1 Instalações, animais e dietas	81
3.3.2 Delineamento experimental	81
3.3.3 Desafio de estresse e infecção experimental	83
3.3.4 Análises biologia molecular	83
3.3.5 Análises estatísticas	86
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.4.1 Expressão relativa do gene <i>interleucina 1 beta (il1β)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	87
3.4.2 Expressão relativa do gene da <i>imunoglobulina m (igm)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	89
3.4.3 Expressão relativa do gene <i>interferon gama (ifnγ)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	90
3.4.4 Expressão relativa do gene <i>interleucina 6 (il6)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	91
3.4.5 Expressão relativa do gene <i>interleucina 10 (il10)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	92
3.4.6 Expressão relativa do gene <i>lisozima (lys)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	93
3.4.7 Expressão relativa do gene <i>componente três do complemento (c3)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	94
3.4.8 Expressão relativa do gene <i>ciclo-oxigenase dois (cox2)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	94
3.4.9 Expressão relativa do gene da <i>proteína mixovírus resistance (mx)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	96

3.4.10 Expressão relativa do gene <i>proteína de choque térmico 70 (hsp70)</i> em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.	98
3.4.11 Análise de correlação	99
3.5 CONCLUSÃO	101
3.6 REFERÊNCIAS	102
4 - CAPÍTULO 4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO β-GLUCANO SOBRE A IMUNIDADE E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE TILÁPIAS (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) EM SITUAÇÃO DE ESTRESSE.....	106
4.1 INTRODUÇÃO	108
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	109
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	109
4.3.1 Animais e dietas.....	110
4.3.2 Delineamento experimental	110
4.3.3 Desafio de estresse e infecção experimental	111
4.3.4 Análises laboratoriais	112
4.3.4.1 Atividade da lisozima no soro	112
4.3.4.2 Atividade hemolítica do complemento – Via alternativa.....	113
4.3.4.3 Atividade respiratória de leucócitos	114
4.3.4.4 Análises hematológicas	114
4.3.4.5 Avaliações do desempenho zootécnico.....	114
4.3.5 Análises estatísticas	115
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
4.4.1 Atividade da lisozima	115
4.4.2 Atividade hemolítica do complemento	116
4.4.3 Atividade respiratória de leucócitos	117
4.4.4 Parâmetros hematológicos	118
4.4.5 Desempenho zootécnico	119
4.5 CONCLUSÃO	120
4.6 REFERÊNCIAS.....	122

1 - CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Essa dissertação foi dividida em quatro capítulos, sendo o primeiro com considerações gerais sobre todos os assuntos abordados no experimento e os seguintes capítulos com os materiais e as metodologias utilizadas nas análises, bem como os resultados encontrados e as discussões sobre cada item.

1.1 Introdução Geral

O sistema imune inato está presente e preparado mesmo antes da invasão por patógenos e é composto por barreiras de defesa iniciais como as escamas, pele e muco, além de células como granulócitos, monócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK) (ELLIS, 1999) e substâncias antimicrobianas como lisozimas, sistema complemento, interferons, citocinas e imunoglobulinas (CAO *et al.*, 2022). O conjunto de componentes celulares e humorais atuam na defesa contra os microrganismos invasores, toxinas ou mesmo frente a células próprias defeituosas ou que não estejam mais íntegras. Os principais tecidos linfóides de peixes são o rim cranial e o baço e dependendo do estímulo recebido, como por exemplo o estresse, ocorre a maior formação e maturação de diversas células como eritrócitos, granulócitos, monócitos, mastócitos, linfócitos e trombócitos. Portanto, a avaliação dos parâmetros hematológicos pode ser um indicador da presença de doenças e do estado físico dos peixes (STOSKOPF, 1993).

O estresse pode promover tanto a ativação quanto a supressão do sistema imune, endócrino e neural (TORT, 2011) facilitando a instalação de doenças causadas por agentes infecciosos virais, bacterianos, fúngicos e parasitários (ELLIS, 2001). Na tilapicultura os principais agentes infecciosos são *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas spp*, *Edwardsella spp*, *Flavobacterium columnare* e *Francisella spp*, apresentando sinais graves de doença (HE *et al.*, 2023; LUKMAN *et al.*, 2023; ZHAO *et al.*, 2023).

Devido a produção intensiva e ao aparecimento de doenças na aquicultura, diversos estudos têm sido feitos para avaliar o uso de imunoestimulantes como alternativa de imunomodulação e proteção precoce. O β -glucano é um polissacarídeo

encontrado em parede celular de muitas bactérias, plantas e fungos e bastante utilizado na piscicultura com conhecidos efeitos imunomoduladores pelas suas interações nos receptores de membranas (PRRs) de células como macrófagos, monócitos, neutrófilos e células natural killer (BAI *et al.*, 2021; KHANJANI *et al.*, 2023). Em algumas espécies foi observado melhoras nos índices zootécnicos, mas em tilápias não tem observado esse ganho (LU *et al.*, 2019). Em tilápias o β -glucano tem sido amplamente estudado comprovando os efeitos benéficos na imunidade dos animais (ABDELHAMID; ELSHOPAKEY; AZIZA, 2020; DAWOOD, Mahmoud A. O. *et al.*, 2020). É esperado que β -glucano auxilie o sistema imune nas respostas inflamatórias frente à agentes patogênicos modulando a expressão de citocinas inflamatórias como *interleucina 6 (Il6)*, *interleucina 8 (Il8)* e *interleucina 1 beta (Il1 β)*, citocinas anti-inflamatórias como *interleucina 10 (Il10)* e imunoglobulinas como *imunoglobulina m (igm)* (AKHTAR, *et al.*, 2021).

1.4 Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 8. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015. 2015.

ABDELHAMID, F. M.; ELSHOPAKEY, G. E.; AZIZA, A. E. Ameliorative effects of dietary *Chlorella vulgaris* and β -glucan against diazinon-induced toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 96, p. 213–222, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464819311374>. Acesso em: 23 mar. 2023.

ABO-AL-ELA, H. G.; EL-NAHAS, A. F.; MAHMOUD, S.; IBRAHIM, E. M. The extent to which immunity, apoptosis and detoxification gene expression interact with 17 alpha-methyltestosterone. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 60, p. 289–298, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464816307598>. Acesso em: 20 mar. 2023.

ACOSTA, F.; LOCKHART, K.; GAHLAWAT, S. K.; REAL, F.; ELLIS, A. E. Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 255–263, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464804000233>. Acesso em: 20 mar. 2023.

ACOSTA, F.; PETRIE, A.; LOCKHART, K.; LORENZEN, N.; ELLIS, A. E. Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS–DNA vaccination. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 81–89, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464804000695>. Acesso em: 20 mar. 2023.

AKHTAR, M. S.; TRIPATHI, P. H.; PANDEY, A.; CIJI, A. β -glucan modulates non-specific immune gene expression, thermal tolerance and elicits disease resistance in endangered *Tor putitora* fry challenged with *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 119, p. 154–162, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821003041>. Acesso em: 20 mar. 2023.

ALVES, A. P. N. N.; VERDE, M. E. Q. L.; FERREIRA JÚNIOR, A. E. C.; SILVA, P. G. de B.; FEITOSA, V. P.; LIMA JÚNIOR, E. M.; MIRANDA, M. J. B. de; MORAES FILHO, M. O. de. **Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo**. *Revista Brasileira de Queimaduras*, Limeira, v. 14, n. 3, p. 203–210, jul./set. 2015. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/16376>. Acesso em: 20 mar. 2023.

ARTS, J. A. J.; TIJHAAR, E. J.; CHADZINSKA, M.; SVELKOU, H. F. J.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L. Functional analysis of carp interferon- γ :

evolutionary conservation of classical phagocyte activation. **Fish & shellfish immunology**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 793–802, 2010.

ASEA, A. Heat Shock Proteins and Toll-Like Receptors. In: BAUER, Stefan; HARTMANN, Gunther (org.). **Toll-Like Receptors (TLRs) and innate immunity**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. (Handbook of Experimental Pharmacology). p. 111–127. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-540-72167-3_6. Acesso em: 23 mar. 2023.

AVILÉS-TRIGUEROS, M.; QUESADA, J. A. Presence of interdigitating cells in thymus of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Teleost). **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 224, n. 2, p. 199–203, 1995.

BAI, J.; LI, T.; ZHANG, W.; FAN, M.; QIAN, H.; LI, Y.; WANG, L. Systematic assessment of oat β -glucan catabolism during in vitro digestion and fermentation. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 348, p. 129116, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621001187>. Acesso em: 23 mar. 2023.

BAI, Y.; LIAO, Y.; SONG, Y.; WANG, J.; DENG, X.; LUAN, L.; AN, N.; ZHOU, W.; LIANG, T.; YANG, Y.; LI, X. Dietary yeast culture alleviates intestinal-hepatic damage related to TLR2-MyD88-NF- κ B signaling pathway and antioxidant capability in *Pseudobagrus ussuriensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 130, p. 428–435, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464822006039>. Acesso em: 23 mar. 2023.

BAYNE, C. J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 725–743, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X01000337>. Acesso em: 20 mar. 2023.

BILLER, J. D.; TAKAHASHI, L. S. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 90, p. 3403–3414, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/aabc/a/M6fj9WYtXzQtBx3KmVPZNKs/?lang=en>. Acesso em: 12 abr. 2023.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MINGATTO, F. E.; URBINATI, E. C. The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 360–367, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464815301479>. Acesso em: 27 mar. 2023.

BILLER-TAKAHASHI, J.; TAKAHASHI, L.; SAITA, M.; GIMBO, R.; URBINATI, E. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 425–429, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842013000200425&lng=en&tlng=en. Acesso em: 4 abr. 2023.

CALLEWAERT, L.; MICHIELS, C. W. Lysozymes in the animal kingdom. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 127–160, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-010-0015-5>. Acesso em: 24 mar. 2023.

CAO, Y.; HUANG, H.; LI, Y.; DENG, J.; TAN, B. Effects of dietary supplemented with a combination of magnolol, palmatine and β -glucan on growth rate, antioxidant activity, immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, [s. l.], v. 27, p. 101337, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513422003337>. Acesso em: 20 mar. 2023.

CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 529–541, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464899902103>. Acesso em: 24 mar. 2023.

CHAKRABORTY, S.; DEVI RAJESWARI, V. Biomedical aspects of beta-glucan on glucose metabolism and its role on primary gene PIK3R1. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 99, p. 105296, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464622003668>. Acesso em: 20 mar. 2023.

CHANG, P. H.; PLUMB, J. A. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 39–45, 1996.

CHANTANACHOOKHIN, C.; SEIKAI, T.; TANAKA, M. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 143–155, 1991. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004484869190294H>. Acesso em: 20 mar. 2023.

CHEN, J.; DONG, Z.; LEI, Y.; YANG, Y.; GUO, Z.; YE, J. β -glucan mitigation on toxicological effects in monocytes/macrophages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following copper exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 121, p. 124–134, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464822000031>. Acesso em: 20 mar. 2023.

CHEN, M.; WANG, R.; LI, L.; LIANG, W.; WANG, Q.; HUANG, T.; LI, C.; LI, J.; GAN, X.; LEI, A.; HUANG, W.; LUO, H. Immunological enhancement action of endotoxin-free tilapia heat shock protein 70 against *Streptococcus iniae*. **Cellular Immunology**, [s. l.], v. 290, n. 1, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874913002086>. Acesso em: 27 mar. 2023.

CHENG, X.; JIANG, X.; SONG, Y.; GAO, J.; XUE, Y.; HASSAN, Z.; GAO, Q.; ZOU, J. Identification and modulation of expression of a TNF receptor superfamily member

25 homologue in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture and Fisheries**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 28–35, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468550X19301911>. Acesso em: 24 mar. 2023.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. β -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & shellfish immunology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 384–396, 2008.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. **Aquaculture**, [s. l.], v. 454, p. 243–251, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848615303033>. Acesso em: 20 mar. 2023.

DAWOOD, M. A. O.; METWALLY, A. E.-S.; EL-SHARAWY, M. E.; ATTA, A. M.; ELBIALY, Z. I.; ABDEL-LATIF, H. M. R.; PARAY, B. A. The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. **Aquaculture**, [s. l.], v. 523, p. 735205, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484862030020X>. Acesso em: 21 mar. 2023.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 291–308, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464898901929>. Acesso em: 20 mar. 2023.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 827–839, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X01000386>. Acesso em: 20 mar. 2023.

FALCO, A.; FROST, P.; MIEST, J.; PIONNIER, N.; IRNAZAROW, I.; HOOLE, D. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1051–1057, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464812000800>. Acesso em: 20 mar. 2023.

FERNÁNDEZ-TRUJILLO, M. A.; GARCÍA-ROSADO, E.; ALONSO, M. C.; BORREGO, J. J.; ALVAREZ, M. C.; BÉJAR, J. Differential antiviral activity of Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from gilthead seabream (*Sparus aurata*) against Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV). **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 107–114, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589011006912>. Acesso em: 20 mar. 2023.

FIERRO-CASTRO, C.; ROTLLANT, J.; CERDÁ-REVERTER, J. M.; TORT, L. Loss-of-function mutations in melanocortin-1 receptor modulate immune response in teleost fishes. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 131, p. 838–846, 2022.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464822007409>. Acesso em: 24 mar. 2023.

FIGUERAS, A.; M. SANTARÉM, M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of β -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 59–68, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242798001147>. Acesso em: 20 mar. 2023.

FINK, I. R.; PIETRETTI, D.; VOOGDT, C. G. P.; WESTPHAL, A. H.; SAVELKOUL, H. F. J.; FORLENZA, M.; WIEGERTJES, G. F. Molecular and functional characterization of Toll-like receptor (Tlr)1 and Tlr2 in common carp (*Cyprinus carpio*). **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 56, p. 70–83, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464816304107>. Acesso em: 20 mar. 2023.

FURNES, C.; SEPPOLA, M.; ROBERTSEN, B. Molecular characterisation and expression analysis of interferon gamma in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 285–292, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464808002878>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GALLAUGHER, P.; AXELSSON, M.; FARRELL, A. P. Swimming performance and haematological variables in splenectomized rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 171, n. 1, p. 301–314, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.171.1.301>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GAN, Z.; CHEN, S. N.; HUANG, B.; ZOU, J.; NIE, P. Fish type I and type II interferons: composition, receptor usage, production and function. Reviews in **Aquaculture**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 773–804, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/raq.12349>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GAO, C.; CAI, X.; LYMBERY, A. J.; MA, L.; CAO, M.; LI, C. Integrative transcriptomic profiling reveals the key pathways in the regulation mechanism of fish intestine-spleen immunity during the bacterial challenges. **Aquaculture**, [s. l.], v. 568, p. 739320, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848623000935>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GAO, F.; LIU, J.; LU, M.; LIU, Z.; WANG, M.; KE, X.; YI, M.; CAO, J. Nile tilapia Toll-like receptor 7 subfamily: Intracellular TLRs that recruit MyD88 as an adaptor and activate the NF- κ B pathway in the immune response. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 125, p. 104173, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X21001816>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GAO, F.; PANG, J.; LU, M.; LIU, Z.; WANG, M.; KE, X.; YI, M.; CAO, J. Nile tilapia TLR3 recruits MyD88 and TRIF as adaptors and is involved in the NF- κ B pathway in the immune response. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.],

v. 218, p. 878–890, 2022. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813022016397>. Acesso em:
 20 mar. 2023.

GAO, F.-Y.; ZHOU, X.; LU, M.-X.; WANG, M.; LIU, Z.-G.; CAO, J.-M.; KE, X.-L.; YI, M.-M.; QIU, D.-G. TLR1 in Nile tilapia: The conserved receptor cannot interact with MyD88 and TIRAP but can activate NF- κ B in vitro. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 127, p. 104300, 2022. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X21003086>. Acesso em:
 20 mar. 2023.

GEIJTENBEEK, T. B. H.; GRINGHUIS, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 465–479, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2569>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GU, Y.-F.; WEI, Q.; TANG, S.-J.; CHEN, X.-W.; ZHAO, J.-L. Molecular characterization and functional analysis of IRF3 in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 55, p. 130–137, 2016. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X15300562>. Acesso em:
 20 mar. 2023.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. **Seminars in Immunology**, [s. l.], v. 26, n. 3, The TNF family - challenges ahead, p. 253–266, 2014. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532314000578>. Acesso em:
 20 mar. 2023.

HE, T.; ZHANG, Y.-Z.; GAO, L.-H.; MIAO, B.; ZHENG, J.-S.; PU, D.-C.; ZHANG, Q.-Q.; ZENG, W.-W.; WANG, D.-S.; SU, S.-Q.; ZHU, S. Identification and pathogenetic study of tilapia lake virus (TiLV) isolated from naturally diseased tilapia. **Aquaculture**, [s. l.], v. 565, p. 739166, 2023. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848622012844>. Acesso em:
 23 mar. 2023.

HECKMAN, T. I.; SHAHIN, K.; HENDERSON, E. E.; GRIFFIN, M. J.; SOTO, E. Development and efficacy of *Streptococcus iniae* live-attenuated vaccines in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 121, p. 152–162, 2022. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821004599>. Acesso em:
 20 mar. 2023.

HERNANDEZ, A. Annual variation of complement, lysozyme and haemagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 479–481, 2003. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105046480300024X>. Acesso em: 24 mar. 2023.

HOLLAND, M. C. H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 399–420, 2002. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464801904085>. Acesso em: 20 mar. 2023.

HUANG, G.; HUANG, S. The structure–activity relationships of natural glucans. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 2890–2901, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.6995>. Acesso em: 20 mar. 2023.

JAULT, C.; PICHON, L.; CHLUBA, J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 759–771, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589003003006>. Acesso em: 20 mar. 2023.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, [s. l.], v. 154, n. 1, p. 1–15, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848697000422>. Acesso em: 20 mar. 2023.

JIA, C.; ZHOU, Y.; HUANG, X.; PENG, X.; LIU, L.; ZHOU, L.; JIN, L.; SHI, H.; WEI, J.; WANG, D. The cellular protein expression of Foxp3 in lymphoid and non-lymphoid organs of Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 300–306, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464815001205>. Acesso em: 23 mar. 2023.

JØRGENSEN, J. B.; JOHANSEN, A.; HEGSETH, M. N.; ZOU, J.; ROBERTSEN, B.; COLLET, B.; SECOMBES, C. J. A recombinant CHSE-214 cell line expressing an Mx1 promoter–reporter system responds to both interferon type I and type II from salmonids and represents a versatile tool to study the IFN-system in teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1294–1303, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464807001258>. Acesso em: 20 mar. 2023.

KHANJANI, M. H.; MOZANZADEH, M. T.; SHARIFINIA, M.; EMERENCIANO, M. G. C. Biofloc: A sustainable dietary supplement, nutritional value and functional properties. **Aquaculture**, [s. l.], v. 562, p. 738757, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848622008742>. Acesso em: 23 mar. 2023.

KOCH, J. F. A.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 112, p. 56–63, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821000450>. Acesso em: 20 mar. 2023.

KÜHLWEIN, H.; EMERY, M. J.; RAWLING, M. D.; HARPER, G. M.; MERRIFIELD, D. L.; DAVIES, S. J. Effects of a dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus*

carpio L.). **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 115, n. 5, p. 1091–1106, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12313>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LI, L.; CHEN, S. N.; LAGHARI, Z. A.; HUO, H. J.; HOU, J.; HUANG, L.; LI, N.; NIE, P. Myxovirus resistance (Mx) gene and its differential expression regulated by three type I and two type II IFNs in mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 105, p. 103604, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X19304896>. Acesso em: 24 mar. 2023.

LI, K.; QIU, H.; YAN, J.; SHEN, X.; WEI, X.; DUAN, M.; YANG, J. The involvement of TNF- α and TNF- β as proinflammatory cytokines in lymphocyte-mediated adaptive immunity of Nile tilapia by initiating apoptosis. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 115, p. 103884, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X20304390>. Acesso em: 24 mar. 2023.

LI, J.-H.; SHAO, J.-Z.; XIANG, L.-X.; WEN, Y. Cloning, characterization and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: The first evidence of Th2-type cytokine in fish. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 2078–2086, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589006005918>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LIMA-JUNIOR, E. M.; PICOLLO, N. S.; MIRANDA, M. J. B. de; RIBEIRO, W. L. C.; ALVES, A. P. N. N.; FERREIRA, G. E.; PARENTE, E. A.; MORAES FILHO, M. O. de. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Limeira, v. 16, n. 1, p.10-7, 2017. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/28917>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LIN, G.-M.; AUDIRA, G.; JUNIARDI, S.; HSIAO, C.-D. Metatranscriptomic analysis reveals co-expression pattern of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) genes among different species of bony fishes in muscle tissue. **Journal of King Saud University - Science**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 3084–3090, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364720302573>. Acesso em: 24 mar. 2023.

LIN, H.; SHE, Y.-H.; CASSILETH, B. R.; SIROTNIAK, F.; CUNNINGHAM RUNDLES, S. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 91–99, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576903002765>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LU, D.-L.; LIMBU, S. M.; LV, H.-B.; MA, Q.; CHEN, L.-Q.; ZHANG, M.-L.; DU, Z.-Y. The comparisons in protective mechanisms and efficiencies among dietary α -lipoic acid, β -glucan and L-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 86, p. 785–793, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464818308222>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LUKMAN, B.; ROSLINDAWANI, M. N.; AZZAM-SAYUTI, M.; NORFARRAH, M. A.; ANNAS, S.; INA-SALWANY, M. Y.; ZAMRI-SAAD, M.; NOR-YASMIN, A. R.; AMIN-NORDIN, S.; BARKHAM, T.; AMAL, M. N. A. Disease development in red hybrid tilapia following single and co-infection with tilapia lake virus and *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 567, p. 739251, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848623000248>. Acesso em: 23 mar. 2023.

LUZIO, A.; MATOS, M.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. A.; MONTEIRO, S. M.; COIMBRA, A. M. Disruption of apoptosis pathways involved in zebrafish gonad differentiation by 17 α -ethinylestradiol and fadrozole exposures. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 177, p. 269–284, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X16301631>. Acesso em: 20 mar. 2023.

MAEKAWA, S.; PULPIPAT, T.; WANG, P.-C.; CHEN, S.-C. Transcriptome analysis of immune- and iron-related genes after *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 111, p. 36–48, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464820307130>. Acesso em: 20 mar. 2023.

MARCUSSO, P. F.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. da S.; VIEIRA, F. C. F.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E. de; MORAES, F. R. de. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, [s. l.], p. 549–554, 2015.

MEIJER, A. H.; GABBY KRENS, S. F.; MEDINA RODRIGUEZ, I. A.; HE, S.; BITTER, W.; EWA SNAAR-JAGALSKA, B.; SPAINK, H. P. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 773–783, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589003003018>. Acesso em: 20 mar. 2023.

MINTE-VERA, C. V.; PETRERE JR, M. Artisanal fisheries in urban reservoirs: a case study from Brazil (Billings Reservoir, São Paulo Metropolitan Region). **Fisheries Management and Ecology**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 537–549, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2400.2000.00218.x>. Acesso em: 20 mar. 2023.

MOHAMMADI, G.; KARIMI, A. A.; HAFEZIEH, M.; DAWOOD, M. A. O.; ABO-AL-ELA, H. G. Pistachio hull polysaccharide protects Nile tilapia against LPS-induced excessive inflammatory responses and oxidative stress, possibly via TLR2 and Nrf2 signaling pathways. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 121, p. 276–284, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821004587>. Acesso em: 23 mar. 2023.

MYRNES, B.; SEPPOLA, M.; JOHANSEN, A.; ØVERBØ, K.; CALLEWAERT, L.; VANDERKELEN, L.; MICHIELS, C. W.; NILSEN, I. W. Enzyme characterisation and gene expression profiling of Atlantic salmon chicken- and goose-type lysozymes.

Developmental & Comparative Immunology, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 11–19, 2013.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X13000244>. Acesso em: 20 mar. 2023.

NAIEL, M. A. E.; SHEHATA, A. M.; NEGM, S. S.; ABD EL-HACK, M. E.; AMER, M. S.; KHAFAGA, A. F.; BIN-JUMAH, M.; ALLAM, A. A. The new aspects of using some safe feed additives on alleviated imidacloprid toxicity in farmed fish: a review.

Reviews in Aquaculture, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 2250–2267, 2020. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/raq.12432>. Acesso em: 20 mar. 2023.

NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. **Developments in Biological Standardization**, [s. l.], v. 90, p. 59–68, 1997.

NGUYEN, H. T.; KANAI, K.; YOSHIKOSHI, K. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. **Aquaculture**, [s. l.], v. 205, n. 1, p. 7–17, 2002.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848601006676>. Acesso em: 20 mar. 2023.

NONAKA, M.; YOSHIKAZI, F. Evolution of the complement system. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 40, n. 12, Innate Immunity, p. 897–902, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589003003213>. Acesso em: 20 mar. 2023.

NOVOA, B.; FIGUERAS, A.; ASHTON, I.; SECOMBES, C. J. In vitro studies on the regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage respiratory burst activity. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 207–216, 1996. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X96000110>. Acesso em: 20 mar. 2023.

NYGAARD, R.; HUSGARD, S.; SOMMER, A.-I.; LEONG, J.-A. C.; ROBERTSEN, B. Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells.

Fish & Shellfish Immunology, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 435–450, 2000. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464899902498>. Acesso em: 20 mar. 2023.

OBA, E. T.; MARIANO, W. dos S.; SANTOS, L. dos. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**, [s. l.], p. 226–247, 2009.

OLIVARES-FUSTER, O.; KLESIOUS, P. H.; EVANS, J.; ARIAS, C. R. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 277–283, 2008.

OLIVEIRA, R. J.; RIBEIRO, L. R.; DA SILVA, A. F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from

barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1225–1233, 2006.

OPPENHEIM, J. J. Cytokines: Past, Present, and Future. **International Journal of Hematology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 3–8, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02982543>. Acesso em: 23 mar. 2023.

PALTI, Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 1263–1272, 2011.

PENG, W.; LU, D.-Q.; LI, G.-F.; ZHANG, X.; YAO, M.; ZHANG, Y.; LIN, H.-R. Two distinct interferon- γ genes in *Tetraodon nigroviridis*: Functional analysis during *Vibrio parahaemolyticus* infection. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 70, p. 34–46, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589015301267>. Acesso em: 20 mar. 2023.

PÉREZ-GUISADO, J. Argumentos a favor de la incorporación de los β -D-glucanos a la alimentación. **Endocrinología y Nutrición**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 315–324, 2007.

PETIT, J.; BAILEY, E. C.; WHEELER, R. T.; DE OLIVEIRA, C. A.; FORLENZA, M.; WIEGERTJES, G. F. Studies into β -glucan recognition in fish suggests a key role for the C-type lectin pathway. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 10, p. 280, 2019.

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

PIAZZON, M. C.; WENTZEL, A. S.; WIEGERTJES, G. F.; FORLENZA, M. Carp Il10a and Il10b exert identical biological activities in vitro, but are differentially regulated in vivo. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 67, p. 350–360, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X16302683>. Acesso em: 20 mar. 2023.

PILARSKI, F.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; DE SOUZA, F. P. B. D.; ZANUZZO, F. S. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish & shellfish immunology**, [s. l.], v. 70, p. 25–29, 2017.

POUYAUD, L.; AGNÈSE, J.-F. Phylogenetic relationships between 21 species of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. **Journal of Fish Biology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 26–38, 1995.

PRADHAN, A.; KHALAF, H.; OCHSNER, S. A.; SREENIVASAN, R.; KOSKINEN, J.; KARLSSON, M.; KARLSSON, J.; MCKENNA, N. J.; ORBÁN, L.; OLSSON, P.-E. Activation of NF- κ B protein prevents the transition from juvenile ovary to testis and promotes ovarian development in Zebrafish *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 45, p. 37926–37938, 2012. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)62419-X/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)62419-X/abstract). Acesso em: 20 mar. 2023.

PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E.; KLESIUS, P.; DA SILVA, V. G. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 41, n. 10, p. 1539–1544, 2010.

RAUTA, P. R.; SAMANTA, M.; DASH, H. R.; NAYAK, B.; DAS, S. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: signaling pathways, expressions and immune responses. **Immunology letters**, [s. l.], v. 158, n. 1–2, p. 14–24, 2014.

REDMOND, A. K.; ZOU, J.; SECOMBES, C. J.; MACQUEEN, D. J.; DOOLEY, H. Discovery of all three types in cartilaginous fishes enables phylogenetic resolution of the origins and evolution of interferons. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 10, p. 1558, 2019.

REIS, I. C. dos; FIERRO-CASTRO, C.; GONÇALVES, G. S.; MOROMIZATO, B. S.; TORT, L.; BILLER, J. D. β -glucan mimics tissue damage signaling and generates a trade-off between head kidney and spleen to activate acquired immunity in vaccinated tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 117, p. 179–187, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821002254>. Acesso em: 27 mar. 2023.

RIBEIRO, R. P. Tilápias no Brasil. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/tilapia-no-brasil/>.

ROBERTSEN, B.; RØPETA-RSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of fish diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 391–400, 1990.

RODRIGUES, F. S.; CHAGAS, S. R.; ROCHA, M. C. V.; DE PAULA NASCENTE, E.; PAULA, F. G.; PASCOAL, L. M. Sistema imune inato de peixes eo uso do alho como imunoestimulante: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e152943014–e152943014, 2020.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H. L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T. J. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 2343–2352, 1999.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, [s. l.], v. 172, n. 1–2, p. 63–92, 1999.

SALAZAR, F.; HALL, L.; NEGM, O. H.; AWUAH, D.; TIGHE, P. J.; SHAKIB, F.; GHAEEMAGHAMI, A. M. The mannose receptor negatively modulates the Toll-like receptor 4–aryl hydrocarbon receptor–indoleamine 2,3-dioxygenase axis in dendritic cells affecting T helper cell polarization. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 137, n. 6, p. 1841–1851.e2, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674915016425>. Acesso em: 20 mar. 2023.

SAVAN, R.; IGAWA, D.; SAKAI, M. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp, *Cyprinus carpio* L. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 270, n. 23, p. 4647–4654, 2003.

SCHLEZINGER, J. J.; BLICKARZ, C. E.; MANN, K. K.; DOERRE, S.; STEGEMAN, J. J. Identification of NF- κ B in the marine fish *Stenotomus chrysops* and examination of its activation by aryl hydrocarbon receptor agonists. **Chemico-biological interactions**, [s. l.], v. 126, n. 2, p. 137–157, 2000.

SEPULCRE, M. P.; LÓPEZ-CASTEJÓN, G.; MESEGUER, J.; MULERO, V. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. **Molecular immunology**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 2009–2016, 2007.

SHAHIN, K.; SHINN, A. P.; METSELAAR, M.; RAMIREZ-PAREDES, J. G.; MONAGHAN, S. J.; THOMPSON, K. D.; HOARE, R.; ADAMS, A. Efficacy of an inactivated whole-cell injection vaccine for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), against multiple isolates of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from diverse geographical regions. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 89, p. 217–227, 2019.

SHEN, C.; HE, J.; ZHU, K.; ZHENG, N.; YU, Y.; HE, C.; YANG, C.; ZUO, Z. Mepanipyrim induces cardiotoxicity of zebrafish (*Danio rerio*) larvae via promoting AhR-regulated COX expression pathway. **Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 125, p. 650–661, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074222000134>. Acesso em: 24 mar. 2023.

SHEN, B.; WEI, K.; YANG, J.; JING, F.; ZHANG, J. Identification and characterization of the c-type lysozyme gene from a marine fish, *Bostrychus sinensis*. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 125, p. 104232, 2021.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, [s. l.], v. 41, n. 1–2, p. 125–139, 1994.

SLAMEŇOVÁ, D.; LÁBAJ, J.; KRIŽKOVÁ, L.; KOGAN, G.; ŠANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1→3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 198, n. 2, p. 153–160, 2003.

SODSUK, P.; MCANDREW, B. J. Molecular systematics of three tilapia genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. **Journal of Fish Biology**, [s. l.], v. 39, p. 301–308, 1991.

SONG, S. K.; BECK, B. R.; KIM, D.; PARK, J.; KIM, J.; KIM, H. D.; RINGØ, E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 40–48, 2014.

SOTO DÁVILA, M.; LATIMER, M. F.; DIXON, B. Chapter 4 - Enhancing immune function and fish health in aquaculture. In: BENFEY, Tillmann J.; FARRELL, Anthony P.; BRAUNER, Colin J. (org.). **Fish physiology**. [S. l.]: Academic Press, 2020.

(Aquaculture). v. 38, p. 123–161. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1546509820300030>. Acesso em: 20 mar. 2023.

SOULLIERE, C.; DIXON, B. **Immune system organs of bony fishes**. [S. l.: s.n.], 2017.

STOSKOPF, M. K. **Clinical pathology in fish medicine**. [S.l.]: WB Saunders Company, Hartcourt Brace Jovanourah Inc, , 1993.

TACCHI, L.; LOWREY, L.; MUSHARRAFIEH, R.; CROSSEY, K.; LARRAGOITE, E. T.; SALINAS, I. Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 435, p. 120–127, 2015.

TAFALLA, C.; BØGWALD, J.; DALMO, R. A. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1740–1750, 2013.

TAKAHASHI, H. K.; SADAMORI, H.; LIU, K.; WAKE, H.; MORI, S.; YOSHINO, T.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, H.; NISHIBORI, M. Role of cell–cell interactions in high mobility group box 1 cytokine activity in human peripheral blood mononuclear cells and mouse splenocytes. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 701, n. 1–3, p. 194–202, 2013.

TANABE, T.; TOHNAI, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [s. l.], v. 68, p. 95–114, 2002.

TOHAMY, A. A.; EL-GHOR, A. A.; EL-NAHAS, S. M.; NOSHY, M. M. β -glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 541, n. 1–2, p. 45–53, 2003.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 1366–1375, 2011.

TRUNG, N. B.; NAN, F.-H.; LEE, M.-C.; LOH, J.-Y.; GONG, H.-Y.; LU, M.-W.; HANG, H. T.; LIN, Y.-L.; LEE, P.-T. Fish-specific TLR18 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) recruits MyD88 and TRIF to induce expression of effectors in NF- κ B and IFN pathways in melanomacrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 119, p. 587–601, 2021.

VALLEJOS-VIDAL, E.; REYES-LÓPEZ, F.; TELES, M.; MACKENZIE, S. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 56, p. 34–69, 2016.

VELÁZQUEZ, J.; ACOSTA, J.; HERRERA, N.; MORALES, A.; GONZÁLEZ, O.; HERRERA, F.; ESTRADA, M. P.; CARPIO, Y. Novel IFN γ homologue identified in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) links with immune response in gills under different stimuli. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 71, p. 275–285, 2017.

VERWILLIGEN, R. A. F.; MULDER, L.; ARAÚJO, P. M.; CARNEIRO, M.; BUSSMANN, J.; HOEKSTRA, M.; VAN ECK, M. Zebrafish as outgroup model to study evolution of scavenger receptor class B type I functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1868, n. 6, p. 159308, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138819812300032X>. Acesso em: 23 mar. 2023.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International journal of food microbiology**, [s. l.], v. 76, n. 1–2, p. 165–168, 2002.

WANG, Y.; BI, X.; CHU, Q.; XU, T. Discovery of toll-like receptor 13 exists in the teleost fish: Miiuy croaker (Perciformes, Sciaenidae). **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 61, p. 25–33, 2016.

WANG, X.; LIU, S.; YANG, Y.; FU, Q.; ABEBE, A.; LIU, Z. Identification of NF- κ B related genes in channel catfish and their expression profiles in mucosal tissues after columnaris bacterial infection. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 70, p. 27–38, 2017.

WANG, Y.-B.; TIAN, Z.-Q.; YAO, J.-T.; LI, W. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, [s. l.], v. 277, n. 3–4, p. 203–207, 2008.

WILHELM FILHO, D. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1229–1237, 2007.

WU, S.; DUAN, C.; KONG, L.; TU, X.; WANG, L.; GUO, Z.; YE, J. Interleukin-10 (IL-10) participates in host defense against bacterial pathogens and promotes IgM antibody production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 531, p. 735829, 2021.

WU, W.; LI, L.; LIU, Y.; HUANG, T.; LIANG, W.; CHEN, M. Multiomics analyses reveal that NOD-like signaling pathway plays an important role against *Streptococcus agalactiae* in the spleen of tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 95, p. 336–348, 2019.

YANG, Y.; FU, Q.; ZHOU, T.; LI, Y.; LIU, S.; ZENG, Q.; WANG, X.; JIN, Y.; TIAN, C.; QIN, Z. Analysis of apolipoprotein genes and their involvement in disease response of channel catfish after bacterial infection. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 67, p. 464–470, 2017.

YOSHIURA, Y.; KIRYU, I.; FUJIWARA, A.; SUETAKE, H.; SUZUKI, Y.; NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. **Immunogenetics**, [s. l.], v. 55, p. 296–306, 2003.

ZANARDI, M. F.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; URBINATI, E. C.; FAGUNDES, M.; SANTOS, M. A. dos; MATAQUEIRO, M. I. Hormone concentration in carcass of Nile

tilapia submitted to early maturation after sexual reversion. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 40, p. 7–11, 2011.

ZAPATA, A. Lymphoid organs of teleost fish. III. Splenic lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 87–94, 1982.

ZHANG, J.; KONG, X.; ZHOU, C.; LI, L.; NIE, G.; LI, X. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways. **Fish & shellfish immunology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 380–388, 2014.

ZHAO, Z.; ZOU, Q.; HAN, S.; SHI, J.; YAN, H.; HU, D.; YI, Y. Omics analysis revealed the possible mechanism of streptococcus disease outbreak in tilapia under high temperature. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 134, p. 108639, 2023.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464823001250>. Acesso em: 23 mar. 2023.

ZOU, J.; SECOMBES, C. J. Teleost fish interferons and their role in immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 1376–1387, 2011.

2 - CAPÍTULO 2: ADMINISTRAÇÃO DE β -GLUCANO ASSOCIADO AO ESTRESSE ESTIMULA O CAMINHO DE SINALIZAÇÃO *TLR – MYD88 – NFK-B1* EM TILÁPIAS DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

RESUMO

O crescimento da piscicultura brasileira ocasionou o aumento de doenças, e consequentes perdas na produção, por isso diversos estudos têm avaliado o uso de imunoestimulantes para prevenção e controle de doenças. Dentre eles destaca-se o β -glucano, composto muito estudado e utilizado na alimentação de peixes. Há evidências de que a administração do β -glucano pode ativar de forma eficaz, diversos mecanismos de defesa. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o β -glucano ativa (ou modifica) os mecanismos de transcrição genica pela via *Tlr-Myd88-Nfkb1* e melhora as respostas imunológicas de tilápias em situação de estresse. Portanto avaliamos a expressão de genes do sistema imune como *receptores Toll-like 1 (tlr1)*, *receptores Toll-like 2 (tlr2)*, *gene resposta primária de diferenciação mieloide (myd88)*, *fator nuclear kappa B1 (nfkb1)*, *fator de necrose tumoral alfa (tnfa)* e *interleucina 8 (il8)*. Um total de 408 tilápias foram distribuídas em 24 caixas de polietileno e divididas randomicamente em oito grupos com 3 repetições cada: C15: Tilápias receberam dieta controle (livre de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 de experimento; C15D: Tilápias receberam dieta controle (livre de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas no 14º dia e foram amostradas aos 15 de experimento; β 15: Tilápias receberam dieta experimental (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 dias; β 15D: Tilápias receberam dieta experimental (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas no 14º dia e foram amostradas aos 15 de experimento; C30: Tilápias receberam dieta controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas aos 30 dias de experimento; C30D: Tilápias receberam dieta controle (livre de β -glucano) por 30 dias, foram desafiadas no 29º dia e foram amostradas aos 30 de experimento; β 30: Tilápias receberam dieta experimental (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas após 30 dias e β 30D: Tilápias receberam dieta experimental (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 30 dias, foram desafiadas no 29º dia e foram amostradas aos 30 de experimento. Nos peixes amostrados aos 15 e 30 dias de experimento, após serem anestesiados, foram coletados rim cranial e baço para análise de expressão dos genes. As análises demonstraram que a associação de β -glucano e manejos estressantes modulou o sistema imune, utilizando o caminho de sinalização da via *Tlr-Myd88-Nfkb1* e estimulou a transcrição dos genes do sistema imune como *tnfa* e *il8*, indicando que esses compostos podem ser usados para promover defesa precoce e proteger peixes contra doenças em situações de estresse.

Palavras-chave: Sistema Imune, Estresse, *Streptococcus*, Expressão Gênica, Tilápia-Do-Nilo. β -glucano.

ABSTRACT

The growth of Brazilian fish farming has led to an increase in diseases and consequent losses in production, which is why several studies have evaluated the use of immunostimulants for disease prevention and control. Among them, β -glucan stands out, a compound that has been extensively studied and used in fish feeding. There is evidence that the administration of β -glucan can effectively activate several defense mechanisms. Thus, the objective of this work was to evaluate whether β -glucan activates (or modifies) the mechanisms of gene transcription via the Tlr-Myd88-Nfkb1 pathway and improves the immune responses of tilapia under stress. Therefore, we evaluated the expression of immune system genes such as *Toll-like receptors 1 (tlr1)*, *Toll-like receptors 2 (tlr2)*, *primary myeloid differentiation response gene (myd88)*, *nuclear factor kappa B1 (nfkb1)*, *tumor necrosis factor alpha (tnfa)* and *interleukin 8 (il8)*. A total of 408 tilapias were distributed in 24 polyethylene boxes and randomly divided into eight groups with 3 replications each: C15: Tilapias received a control diet (free of β -glucan) for 15 days and were sampled after the 15th day of the experiment; C15D: Tilapias received a control diet (free of β -glucan) for 15 days, were challenged on the 14th day and were sampled at the 15th day of the experiment; β 15: Tilapias received experimental diet (1g kg⁻¹ of β -glucan) for 15 days and were sampled after 15 days; β 15D: Tilapias received an experimental diet (1g kg⁻¹ of β -glucan) for 15 days, were challenged on the 14th day and were sampled at the 15th day of the experiment; C30: Tilapias received a control diet (free of β -glucan) for 30 days and were sampled on the 30th day of the experiment; C30D: Tilapias received a control diet (free of β -glucan) for 30 days, were challenged on the 29th day and were sampled at the 30th day of the experiment; β 30: Tilapias received experimental diet (1g kg⁻¹ of β -glucan) for 30 days and were sampled after 30 days and β 30D: Tilapias received experimental diet (1g kg⁻¹ of β -glucan) for 30 days, were challenged on the 29th day and were sampled at 30 of the experiment. In fish sampled at 15 and 30 days of experiment, after being anesthetized, cranial kidney and spleen were collected for gene expression analysis. The analyzes demonstrated that the association of β -glucan and stressful handling modulated the immune system, using the *Tlr-Myd88-Nfkb1* signaling pathway and stimulated the transcription of immune system genes such as *tnfa* and *il8*, indicating that these compounds can be used to promote early defense and protect fish against disease in stressful situations.

Keywords: Immune System, Stress, *Streptococcus*, Gene Expression, Nile Tilapia. β -glucan.

2.1 Introdução

A piscicultura tem aumentado a intensificação como métodos mais sustentável e economicamente rentável de criação e a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem apresentado boa aceitação no mercado nacional por suas características zootécnicas como alta taxa de reprodução e adaptação ao nosso clima, sendo amplamente criada em praticamente todo o território. Porém tem ocorrido o aumento e surgimento de novas doenças, devido principalmente ao estresse decorrente do manejo necessário aos cuidados desses animais como arraçoamentos, biometrias, vacinações e transporte. O estresse provoca mudanças no sistema imune com diversos efeitos danosos à saúde, o que facilita a instalação de doenças. Algumas das doenças que mais afetam a piscicultura nacional são causadas por bactérias como *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. e *Enterococcus* sp. ocasionando perdas econômicas de grande monta aos produtores (SHAHABI *et al.*, 2021).

A fim de evitar doenças e estresse desnecessário aos peixes e ainda diminuir os resíduos de medicamentos nos produtos de consumo humano, direcionamos nossos estudos para o uso do β -glucano, substância com ação pluripotente como imunomoduladora, anti-infecciosa e anti-inflamatórias, e também apresenta capacidade de aumentar as concentrações de anticorpos e estimular a atividade dos macrófagos (FIERRO-CASTRO *et al.*, 2022; WHITTINGTON; LIM; KLESIUS, 2005).

Os mecanismos de defesa do sistema imune dos peixes apresentam componentes inatos e adquiridos, humorais e mediados por células (ELLIS, 2001). A presença de PAMPs (padrões moleculares associado à patógenos) estimulam os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes na superfície das células de defesa a sinalizar o caminho para ativação da resposta imune (PALTI, 2011). Segundo Trung *et al.* (2021b) os receptores *Toll-like* são proteínas evolutivamente conservadas de PRRs e desempenham um papel crucial no início do reconhecimento de PAMPs pelo sistema imunológico inato. Atualmente mais de 28 receptores do tipo *toll* (TLRs) funcionais foram descritos em vertebrados e ao menos 22 em peixes. Alguns receptores possuem funções diferentes e outros compartilham o mesmo grupo de substâncias reconhecidas. Por exemplo o *Tlr4* é um receptor que reconhece lipopolissacarídeos e *Tlr5* reconhece a proteína presente nos flagelos, a flagelina. *Tlr3* reconhece RNA de dupla fita, *Tlr7* e 8 reconhece RNA de fita simples. Em mais de 12

espécies de peixes foram identificados vinte tipos de TLRs e não foi relatado a presença de *Tlr6* (ZHANG *et al.*, 2014).

Os receptores, ativados pelos PAMPs, recrutam proteínas adaptadoras como *Myd88* e *Trif* (proteína adaptadora indutora de interferon) (GAO, F. *et al.*, 2022) para ativar fatores de transcrição genica como *Nfkb1*, que são essenciais para expressão de genes relacionados à imunidade inata e adaptativa (RÜNGELER *et al.*, 1999). *Nfkb* é o principal fator de transcrição nas respostas inflamatórias, estimulando a expressão de gene pró-inflamatórios como *tnfa* e *il1β* (LI; VERMA, 2002; LIANG; ZHOU; SHEN, 2004).

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desse capítulo foram avaliar se a administração de β -glucano à tilápias por 15 ou 30 dias, frente a situações de estresse de manejo:

- Melhora as respostas imunológicas e,
- Ativa os mecanismos de transcrição genica pela via *Tlrs-Myd88-Nfkb1*

2.3 Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no biotério do Laboratório de Imunologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Câmpus de Dracena, São Paulo. Foram utilizadas 24 caixas de polietileno tampadas com telas. O sistema de água foi aberto com renovação constante e a temperatura mantida a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. O local não tinha iluminação natural então havia lâmpadas frias para controle do fotoperíodo (12h luz/ 12h escuro).

2.3.1 Animais

Foram utilizadas 408 tilápias juvenis, revertidas, provenientes de piscicultura da região de Santa Fé do Sul - SP, com o peso inicial médio de 80g. Os peixes foram

distribuídos em 24 caixas, (17 peixes/ caixa) e alimentados durante o período de aclimação (3 semanas) com dieta comercial. Após a aclimação o experimento foi iniciado. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais, no dia 12/07/2018, registrada com o nº: 16/2018R1- CEUA

2.3.2 Dietas

No presente experimento, foram elaboradas duas dietas: Dieta controle (livre de β -glucano) e dieta experimental (dieta controle acrescida de 0,1% de β -glucano, de acordo com Koch; De Oliveira; Zanuzzo (2021) (Tabela 1), ambas preparadas no Instituto de Pesca de São José do Rio Preto – SP, formuladas de acordo com as exigências da espécie. As dietas foram preparadas com alimentos pesados, pré-misturados e moídos em triturador tipo martelo com peneira de 0,8 mm, e incluídos os suplementos minerais. Em seguida, foi incorporada na dieta experimental, o suplemento de 0,1% de β -glucano. A mistura foi umedecida com água a 50°C e submetida ao processo de extrusão com matrizes de 2,5 mm e, posteriormente, seca em estufa de ventilação forçada por 12 horas a 55°C, resultando em um produto com cerca de 10% de umidade. As dietas foram armazenadas em potes plásticos etiquetados de acordo com a caixa e o tratamento; e conservados em geladeira durante todo o experimento.

Tabela 1 – Ingredientes e formulação das rações da dieta controle e da dieta experimental com β -glucano

Matérias primas	(%)
Farelo de soja	34,218
Farinha de vísceras	18,000
Milho	17,511
Farelo de trigo	9,000
Quirera de arroz	8,000
Farinha de carne e ossos	6,686
Protenose	3,446
Fosfato bicálcico	0,755
Óleo de soja	1,000
Premix	0,500
Antifúngico	0,200
Sal	0,300
DL-metionina	0,168
Antioxidante	0,050
Calcário ¹	0,167
β -glucano ²	0,167
Total	100,000

¹ apenas na dieta controle,

² apenas na dieta experimental

2.3.3 Delineamento experimental

Após o período de aclimação 408 tilápias foram distribuídas em 24 caixas de polietileno de 100 L com 17 peixes cada, divididas em arranjo fatorial 2 x 2 x 2, com 3 repetições cada.

Tratamento 1 (C15). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 dias de experimento.

Tratamento 2 (C15D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas aos 14 dias, e foram amostradas após 15 dias de experimento.

Tratamento 3 (β 15). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 dias de experimento.

Tratamento 4 (β 15D). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -

glucano) por 15 dias, foram desafiadas aos 14 dias, e foram amostradas após 15 dias de experimento.

Tratamento 5 (C30). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Tratamento 6 (C30D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram desafiadas aos 29 dias, e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Tratamento 7 (β 30). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Tratamento 8 (β 30D). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 30 dias e foram desafiadas aos 29 dias, e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Os tratamentos “C15D e β 15D” e “C30D e β 30D” foram desafiados (estresse e inoculação de *S. agalactiae*/peixe inativada) aos 14 e 29 dias, respectivamente, e amostrados após 24 horas. Aleatoriamente foram capturados 4 peixes de cada caixa (n=12/tratamento), sedados em solução de óleo de cravo (1 g 10 L⁻¹ de água) e eutanasiados por deslocamento cervical para coleta de rim cranial e baço, utilizados na avaliação da expressão dos genes do sistema imune (*tlr1*, *tlr2*, *myd88*, *nfkb1*, *tnfa* e *il8*).

2.3.4 Desafio de estresse e infecção experimental

O desafio de estresse consistiu em simular alguns manejos ou episódios que são comuns no cultivo de tilápias. Para tal, os peixes passaram por 12 horas de adensamento, produzido pela diminuição de metade do volume de água das caixas. Durante esse período, os peixes sofreram perseguição com puçá por 10 minutos seguido de exposição aérea por 3 minutos, repetidos no período da manhã e da tarde. No final do segundo período foram inoculados, por injeção intraperitoneal de 100 μ L por 100g de peso vivo de suspensão de *S. agalactiae* inativada na concentração de 1,3 x 10⁸ UFC/ mL⁻¹ na cavidade pélvica dos peixes.

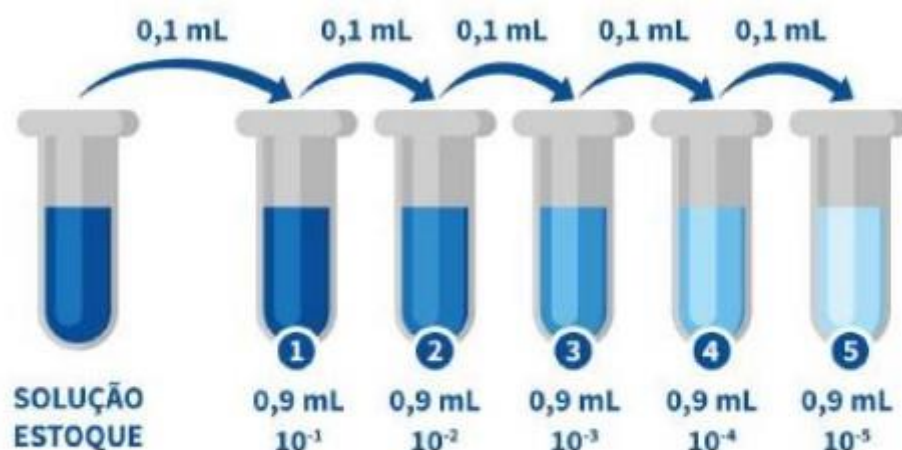
2.3.5 Bacterina para infecção experimental *S. agalactiae* (inativada)

Para a fase final do experimento, foi desenvolvido um protocolo de desafio microbiológico com *S. agalactiae* pelo Laboratório de Imunologia Animal – (LIA)-UNESP Dracena, SP. As bactérias foram adquiridas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (LAPOA-CAUNESP), cujas cepas foram isoladas e identificadas em peixes a partir de sinais clínicos do animal doente. O peixe moribundo passou por assepsia com álcool 70% para coletar os órgãos que foram incubados por 24-48 h à 28°C e semeados em placas de cultura contendo ágar BHI apropriado para isolar a bactéria e caracterizado morfolologicamente com coloração gram. Foi realizada análise molecular para identificação da espécie e o teste de sensibilidade microbiana para achar a concentração mínima inibitória e mínima bactericida.

Na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), campus de Dracena - SP, o crescimento das bactérias foi realizado em garrafas com meio de cultivo BHI. A bactéria foi inoculada 3 vezes com alça de semeadimento e deixadas em estufa à 28°C entre 24 e 48h. Em seguida, foi medida a densidade ótica do meio de cultivo à 625nm. Alíquotas desse meio de cultivo foram conservadas por congelamento, nas quais foram adicionados 1:1 500µL de glicerol estéril e 500µL de meio de cultivo com bactérias em alta DO e foram congelados a -20°C por 30 minutos antes de armazenar a -80°C. Essas cepas estão na FCAT e poderão ser utilizadas em estudos futuros.

Para a realização do desafio, utilizou-se as bactérias que cresceram em meio de cultivo BHI, em densidade ótica alta, em torno de 2 (Leitura em 625 nm) que passaram por inativação. A inativação das bactérias foi feita por aquecimento em garrafa em banho maria à 50°C por 30 min e em seguida, lavadas com PBS 1x e ajustada a OD para 0,37, que representa a DL50 em uma concentração de $1,3 \times 10^8$ UFC/ mL⁻¹, determinado previamente por estudo realizados pelo LAPOA. Entretanto, para verificação da concentração utilizada, foi realizado plaqueamento do meio de cultivo para contagem das UFCs utilizadas. Para isso, o meio de cultivo utilizado passou por diluição seriada e foi semeado em placa com meio sólido PCA (Figura 04).

Figura 4 - Diluições do meio de cultura de bactérias para a contagem de células



Após a diluição, foram semeadas as diluições entre 10⁻⁶ e 10⁻¹⁰ por triplicata. No fundo da placa foi colocado 1 mL da diluição, adicionado o meio PCA (por cima das bactérias) e misturados por agitação em várias direções. Por fim, foi deixado o meio solidificar, fechando as placas, que foram colocadas em estufa para incubação a 28°C para que fosse possível contar as bactérias.

Por último, foi feita a injeção intraperitoneal individualmente de 100µL por 10g de peso vivo de suspensão de *S. agalactiae* inativada (aquecimento a 50°C por 30 min) na concentração de 1,3 x 10⁸ UFC/ mL⁻¹ na cavidade pélvica dos peixes dos tratamentos C15D e β15D aos 14 dias, e tratamentos C30D e β30D aos 29 dias.

Diversos estudos apresentam desafios com a bactéria atenuada ou viva, mas apresentam alta mortalidade. Neste caso, utilizamos a bactéria inativada para avaliar se houve a potencialização da resposta imunológica dos peixes.

2.3.6 Análises de biologia molecular- *real-time quantitative PCR* (qRT-PCR)

O rim cranial e o baço foram coletados de acordo com cada protocolo experimental e armazenados em freezer -80°C até a realização das análises. O material passou por extração do RNA para análise da expressão dos genes pela técnica de qRT-PCR. A extração de RNA das amostras foi obtida com a utilização de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em equipamento que determina a quantidade de RNA em ng (Nanodrop). A partir do RNA extraído, componente que apresenta pouca

estabilidade, foi obtido o cDNA por transcrição reversa (RT) sintetizado pelo script™.

Em seguida a sequência foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers desenhados (selecionados em literatura para a espécie *Oreochromis niloticus*) (Tabela 2), dNTPs e enzima DNA polimerase de Taq. (iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)). A reação de amplificação foi realizada em equipamento termociclador de RT-PCR, que proporcionou os ciclos de temperatura necessários para desnaturação do DNA (alta temperatura, normalmente em torno de 95°C), hibridação dos primers com o DNA template (temperatura baixa, em torno de 48°C) e temperatura mediana (em torno de 68°C) ponto ótimo da polimerase, que irá incorporar os dNTPs para a extensão das fitas. As temperaturas para os ciclos desnaturação-hibridização-síntese resultaram na síntese de centenas de milhões de cópias do fragmento de DNA amplificado. O limiar da fase exponencial da reação é detectado durante os ciclos de temperatura e é denominado de Cycle Threshold (Ct), a partir do qual se quantifica exatamente os produtos da reação de amplificação devido à emissão de fluorescência (Sybr Green e o Taqman são os fluoróforos mais utilizados). O equipamento apresenta um termociclador e sistema ótico para a excitação da fluorescência, além de softwares para analisar as informações resultantes. A fluorescência emitida representa a quantidade do produto amplificado e aumenta de acordo com o resultado da reação, e a fim de avaliar o transcriptoma, avalia-se através de programas computacionais qual tratamento promoveu maior amplificação do RNAm (“fold-change”). Os resultados foram analisados por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (PFAFFL, 2001).

Os primers *β actin-b* (*beta actina*) e *ef1 α _a* (*elongator factor*) foram utilizados como genes de referência para normalizar os dados dos genes específicos. Genes de referência ou manutenção (*housekeeping*) podem ser utilizados como normalizadores da qPCR-RT, pois eles são expressos em células e tecidos, e não apresentam alterações na sua expressão, mesmo sob condições experimentais (REBOUÇAS *et al.*, 2013). Os grupos “controle” nos dois períodos foram utilizados como modelo para calcular o aumento da expressão gênica nos demais grupos. A sequência de primers utilizado no experimento estão listados abaixo (quadro 1)

Quadro 1 - Sequência de primers do capítulo 2

Gene	Sequência Fw/Rv (5'-3')	PB	Ta	Número de acesso	Referência
<i>β-actin b</i>	F: GTGCCCATCTACGAGGGTTA R: CTCTTTGATGTCACGCACGA	156		KJ126772	Mahmoud A. O. Dawood et al. 2020
<i>ef1α_a</i>	F: ATCAAGAAGATCGGCTACAACCCT R: ATCCCTTGAACCAGCTCATCTTGT	109	60° C	AB075952.1	Dong-Liang Lu et al. (2019)
<i>myd88</i>	F: TTTACGCTTCCTCACCATTGT R: CCGCCTGCTCCACAGTTAT	106		NM_001311322.1	Samwel McheleLimbu et al. 2020
<i>nfkβ1</i>	F: CGACCACTACCTACAGCTC R: GATGTCGTTTGAGGCATCGC	96		XM_019363515.2	Samwel McheleLimbu et al. 2020
<i>tlr1</i>	F: CTACAACGCCATCCAAACGC R: ACTGTGGCTGAAATCTCCCG	105		XM_005460356.3	Rui Jia et al. 2019
<i>tlr2</i>	F: AAAGCATAGATGAGTTCCACATCC R: GTAAGACAAGGCATCACAAACACC	146		JQ809459.1	Rui Jia et al. 2019
<i>tnfa</i>	F: CAGAAGCACTAAAGGCGAAGAACA R: TTCTAGATGGATGGCTGCCTTG	98	60° C	NM_001279533 / AY428948.1	Dong-Liang Lu et al. (2019)
<i>il-8</i>	F: GCACTGCCGCTGCATTAAG R: GCAGTGGGAGTTGGGAAGAA	85	60° C	NM_001279704	Abo-Al-Ela et al. (2017)

Fonte: Elaborado pela autora

2.3.7 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância adotado de 5%, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.4 M7.

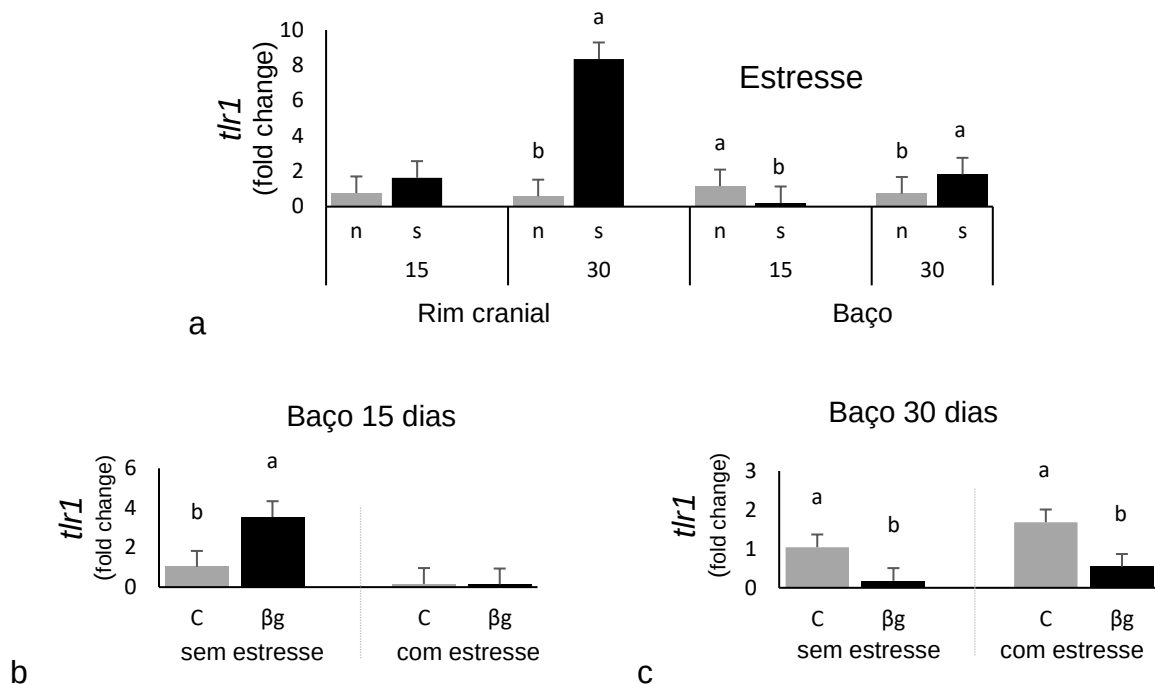
2.4 Resultados e Discussão

Neste item serão apresentados os resultados e as discussões relativos aos dados obtidos no experimento, com os genes e a metodologia descrita acima.

2.4.1 Expressão relativa do gene *receptor toll like 1 (tlr1)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Em tilápias a expressão do gene *tlr1* foi demonstrado em vários órgãos como baço, rim cranial, pele, intestino e brânquias, porém a maior quantidade foi encontrada no baço (GAO, F.-Y. *et al.*, 2022). Neste experimento foi observado que os peixes desafiados mostraram aumentos desse gene em 30 dias de tratamento nos dois órgãos analisados. No baço os resultados mostraram interação entre as dietas, os dias e o estresse sendo que em 15 dias, sem desafio, houve aumento do gene com o uso do aditivo, mas com 30 dias, com e sem desafio, a dieta com β -glucano apresentou diminuição da expressão do gene, indicando imunomodulação. No entanto, no rim cranial não vimos diferenças significativas entre os fatores analisados (Figura 5). Semelhantes resultados foram encontrados em turbot (*Scophthalmus maximus* L.) (YU *et al.*, 2021). Após estimulação com LPS a expressão de *tlr1* em baço de peixe miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) apresentou variações no decorrer das horas, tendo aumentado 13,5 vezes após 12 horas e retornado a normal em 24 horas (CHU *et al.*, 2017). Em tilápias desafiadas com *S. agalactiae*, houve aumento da expressão do gene observado em rim cranial e baço em 8 horas e ainda em 1 dia após (GAO, F.-Y. *et al.*, 2022). Em experimento com bagre africano alimentados com PACAP (polipeptídeo ativador da pituitária adenilato ciclase) a expressão de *tlr1* no baço foi mais alta antes do desafio, porém diminuiu em baço e rim cranial 48 horas após o desafio com *P. aeruginosa* (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Figura 5 - Expressão relativa do gene *tlr1* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR

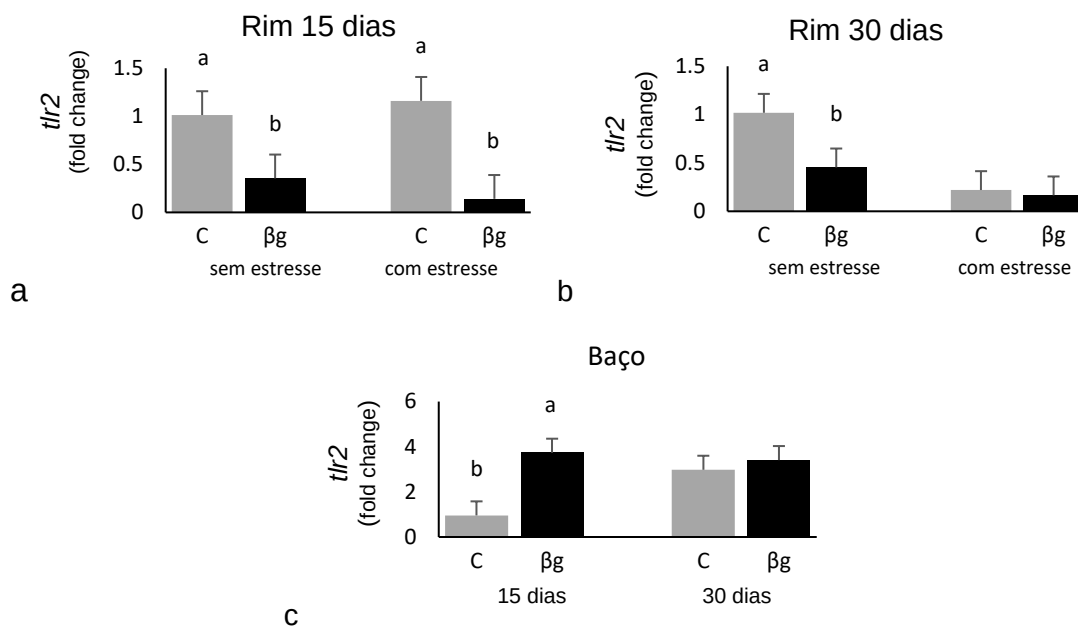


Legenda: a – estresse; b – baço em tratamento por 15 dias; c – baço em tratamento por 30 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$ C= dieta controle, βg = dieta β -glucano, n=sem estresse, s=com estresse. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte: Elaborado pela autora.

2.4.2 Expressão relativa do gene *receptor toll like 2* (*tlr2*) em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Observamos que os animais tratados com β -glucano apresentaram diminuição da expressão do gene *tlr2* no rim nos dois períodos, mas no baço ocorreu o inverso para o gene apenas com 15 dias. O desafio nos animais tratados por 15 dias com β -glucano provocou grande queda do gene, em relação aos alimentados com a ração controle, observado no rim, mas no baço não apresentou diferenças significativas (Figura 6). Em outro experimento também com tilápias, mas desafiadas com PBS e recebendo dieta basal apresentaram grande aumento na expressão do gene *tlr2*, *myd88* e *nfbk* 24 horas após o desafio, mas o grupo que foi suplementado com 0,2 e 0,6% de polissacarídeo de casca de pistache tiveram diminuição da expressão do gene (MOHAMMADI *et al.*, 2022).

Figura 6 - Expressão relativa do gene *tlr2* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano por RT-PCR

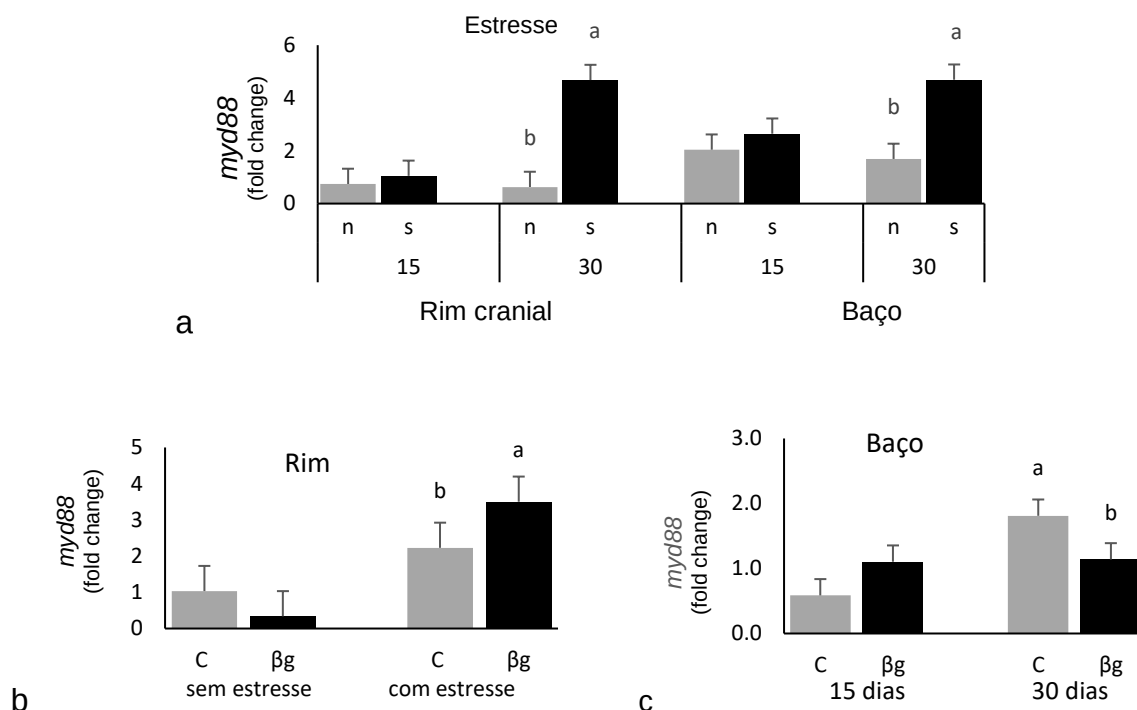


Legenda: 6a, 6b - rim; 6c - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$ C= dieta controle, βg= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte: Elaborado pela autora.

2.4.3 Expressão relativa do gene *resposta primária de diferenciação mieloide 88 (myd88)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Frente ao estresse aumentos da expressão do gene *myd88* foram observados em 30 dias de experimento, nos dois órgãos estudados. No rim cranial esse desafio provocou significativo aumento da expressão do gene *myd88* nos peixes alimentados com β -glucano em relação à dieta controle. No baço a diferença estatística foi observada em 30 dias de suplementação, mostrando diminuição da expressão do gene com o uso dessa dieta, independente do estresse (Figura 7). O β -glucano é um PAMP reconhecido pelo *Tlr2*, um membro da família TLRs, e esse reconhecimento ativou a expressão do gene *myd88* e consequentemente o gene *nfkb*, que induz a produção de citocinas inflamatórias como *Il8*, *Il1β*, *Il10*, entre outras (BAI *et al.*, 2022).

Figura 7 - Expressão relativa do gene *myd88* em rim e baço de tilápias alimentadas com β - glucano, por RT-PCR



Legenda: a estresse; b rim; c - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

P < 0.05, C= dieta controle, β g= dieta β -glucano, n=sem estresse, s=com estresse.

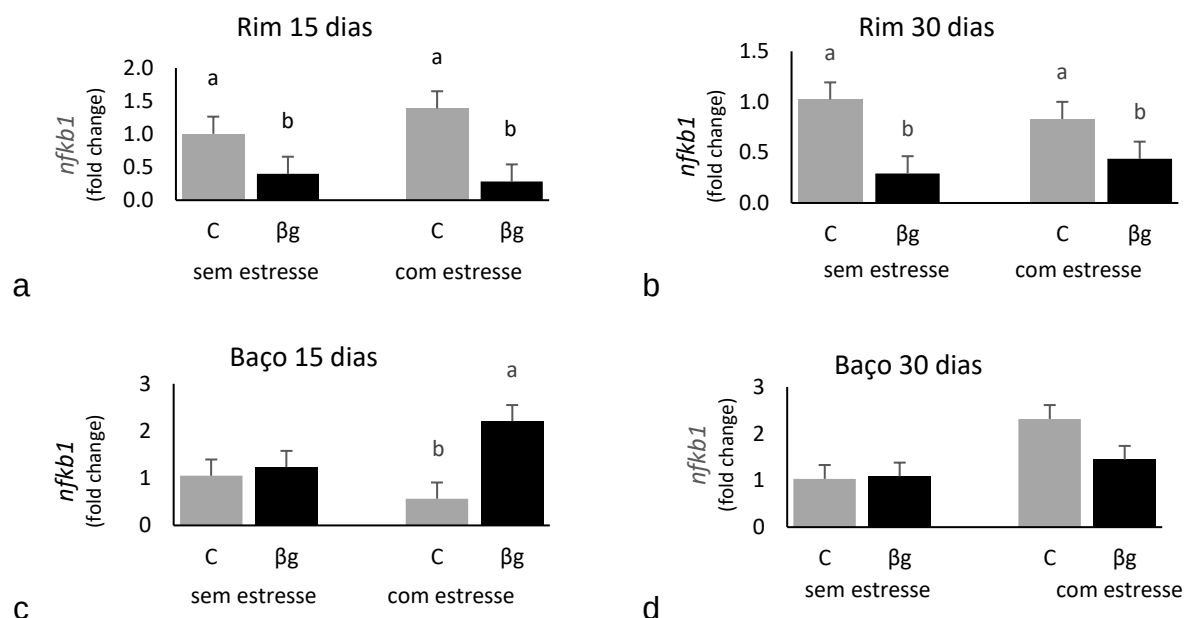
Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte: Elaborado pela autora.

2.4.4 Expressão relativa do gene *fator nuclear NF-kappa-B1 (nfkb1)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

A proteína *Nfkb* é o principal fator de transcrição nas respostas inflamatórias, estimulando a expressão de genes pró-inflamatórios como *tnfa* e *il1 β* , ativado por *Myd88* (GAO, F.-Y. *et al.*, 2022). Nesse experimento, a análise da expressão do gene *nfkb1* mostrou interação entre os 3 fatores e, em rim cranial, nos dois períodos e com e sem desafio, a dieta com β -glucano mostrou valores menores em relação à dieta controle, indicando imunomodulação. Ainda, a administração de β -glucano por 15 dias estimulou o fator de transcrição *nfkb1* no baço associado ao estresse (Figura 8). Em outro estudo, também com tilápias, alimentados com extrato de Ginkgo biloba e desafiadas com herbicida glifosfato apresentaram inibição da via *Nfkb* e a expressão de seus genes-alvo como *tnfa* e *il1 β* em comparação com dieta controle (ZHENG *et al.*, 2022). Em outro estudo com a mesma espécie de peixe foi mostrado que o efeito citotóxico da ciclofosfamida injetado em tilápias, reduziu significativamente os níveis de *tlr2*, *myd88* e *nfkb1*, em 4 dias após desafio comparados ao grupo controle, indicando inibição da resposta imune frente à desafio e confirmando o caminho da

expressão de genes do sistema imune (CAO *et al.*, 2021).

Figura 8 - Expressão relativa do gene *nfk1* em rim e baço de tilápias alimentadas com β - glucano, por RT-PCR



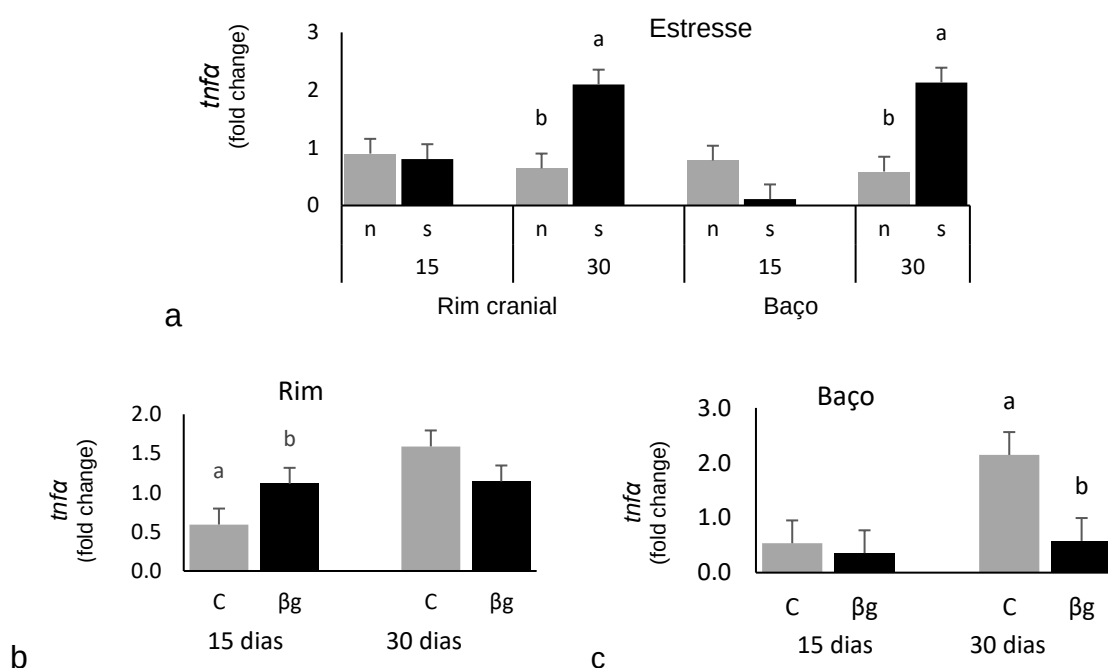
Legenda: a, b – rim; c, d - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. P < 0.05, C= dieta controle, β g= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte: Elaborado pela autora.

2.4.5 Expressão relativa do gene *fator de necrose tumoral alfa (tnfa)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

A expressão do gene *tnfa* mostrou que o desafio, em 30 dias de experimento, provocou estimulação imune nos dois órgãos estudados. A adição de β -glucano aumentou a expressão desse gene em 15 dias no rim cranial e diminuiu em 30 dias no baço. (Figura 9). Resultados semelhantes foram observados por Reis *et al.* (2021) com aumentos de *tnfa* α em rim cranial de tilápias alimentadas por 15 dias com 0,1% de β -glucano e 30 dias após vacinação (AquaVac® STREP SA, MSD) e 15 dias após desafio com *S. agalactiae* esse aumento continuou. Em estudo também com tilápias foi demonstrado que suplementação com β -glucano resultou em expressões significativamente mais altas de *tnfa* e *il1 β* , enquanto altas densidades de criação diminuiram a transcrição de *tnfa* e *il1 β* (DAWOOD, Mahmoud A.O. *et al.*, 2020a). Salah; El Nahas; Mahmoud (2017) mostraram que o gene *tnfa* teve maior expressão nos peixes alimentados com 0,2% de β -glucano do que com 0,1% do imunoestimulante até 3 dias após desafio com *Streptococcus iniae*. A inclusão de 1 e 1,5% de β -glucano na ração barbo (*Tor putitora*) mostrou aumentos significativos na expressão de *tnfa*, mas quando esses peixes passaram por desafio com injeção de A.

salmonicida essa diferença só foi observada com 1% de β -glucano (AKHTAR, M. S. *et al.*, 2021). A adição de goma arábica na dieta por 8 semanas não apresentou diferenças significativas na expressão do gene *tnfa* em rim cranial e baço de tilápias (NAIEL, M. A. E. *et al.*, 2022).

Figura 9 Expressão relativa do gene *tnfa* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

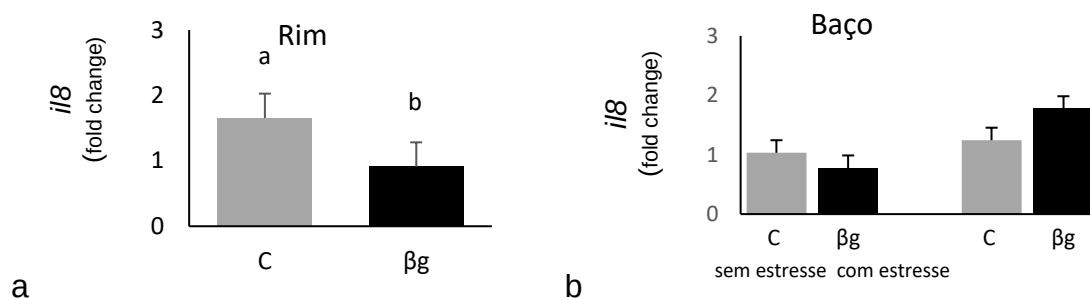


Legenda: a - estresse; b - rim; c - baço, figura. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$ C= dieta controle, βg = dieta β -glucano, n=sem estresse, s= com estresse. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte: Elaborado pela autora

2.4.6 Expressão relativa do gene *interleucina 8 (il8)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Não vimos diferenças significativas da expressão do gene *il8* em baço, mas em rim cranial a adição do β -glucano na dieta dos peixes diminui o valor desse gene, comparando com a dieta controle (Figura 10). Tilápias alimentadas com 1, 1.5 e 2% de óleo de coentro (*Coriandrum sativum* L) e desafiadas com *A. hydrophila* apresentaram aumento da expressão de *igm* e *il8* em rim cranial, em comparação ao grupo controle (DAS; PRADHAN; PILLAI, 2023). Outro experimento com tilápias suplementadas com casca de manga em pó, em sistema de bioflocos também mostraram aumentos significativos na expressão de *il8*. **Truta arco-íris alimentadas por 20 dias com ácido transcinâmico na concentração de 750 e 1500 mg kg⁻¹ mostraram aumento da expressão desse gene em rim cranial, em comparação com outros grupos (YILMAZ; ERGÜN, 2018).**

Figura 9 - Expressão relativa do gene *i/8* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



Legenda: a rim cranial; b- baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

P < 0.05. C= dieta controle, βg = dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte: Elaborado pela autora

2.4.7 Análise de correlação dos genes

A análise da matriz de correlação mostrou resultados positivos no rim cranial entre os genes *tlr1* com *myd88*, *tnfa* e *il8*; *tlr2* com *nfkb1*; *myd88* com *tnfa* e *il8*, como visto na tabela 2

Tabela 2 - Correlação da expressão de genes em rim cranial de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo

Rim cranial	<i>nfkb1</i>	<i>tlr1</i>	<i>tlr2</i>	<i>myd88</i>
<i>nfkb1</i>	1,000	-0,080	0,787	-0,181
<i>tlr1</i>		1,000	-0,474	0,807
<i>tlr2</i>			1,000	-0,512
<i>myd88</i>				1,000

Números em negrito indicam boa correlação, $p < 0.05$. Fonte: Elaborado pela autora.

No baço a maior correlação entre os genes estudados foi entre *tlr2* com *nfkb1* (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação da expressão de genes em baço de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo

Baço	<i>nfkb1</i>	<i>tlr1</i>	<i>tlr2</i>	<i>myd88</i>
<i>nfkb1</i>	1,000	0,184	0,748	0,559
<i>tlr1</i>		1,000	0,138	0,348
<i>tlr2</i>			1,000	0,585
<i>myd88</i>				1,000

Números em negrito indicam boa correlação, $p < 0.05$. Fonte: Elaborado pela autora

2.5 Conclusão

Sabe-se que compostos imunoestimulantes ativam diversos componentes do sistema inato e adquirido de defesa e promovem defesa sistêmica contra doenças (DE SOUZA *et al.*, 2020) e foi ilustrado que as células imunes possuem receptores para β -glucano que facilitam a passagem dessas moléculas para dentro das células iniciando o processo de destruição dos agentes agressores (MOHAMMADI *et al.*, 2022). No presente estudo, a infecção com *S. agalactiae* e manejos de estresse foram avaliados, e o β -glucano mostrou-se eficiente para ativação do sistema imune e defesa contra esses agravos indicando que esse composto pode ser usado para promover defesa precoce e proteger peixes contra doenças.

2.6 Referências

- AKHTAR, M. S. et al. β -glucan modulates non-specific immune gene expression, thermal tolerance and elicits disease resistance in endangered *Tor putitora* fry challenged with *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 119, p. 154–162, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821003041>. Acesso em: 20 mar. 2023.
- BAI, Y. et al. Dietary yeast culture alleviates intestinal-hepatic damage related to TLR2-MyD88-NF- κ B signaling pathway and antioxidant capability in *Pseudobagrus ussuriensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 130, p. 428–435, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464822006039>. Acesso em: 23 mar. 2023.
- CAO, L. et al. Effects of cyclophosphamide on antioxidative and immune functions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) via the TLR-NF- κ B signaling pathway. *Aquatic Toxicology*, [s. l.], v. 239, p. 105956, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X21002150>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- CHU, Q. et al. Up-regulated of miR-8159-5p and miR-217-5p by LPS stimulation negatively co-regulate TLR1 in miiuy croaker. *Developmental & Comparative Immunology*, [s. l.], v. 67, p. 117–125, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X16303135>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- DAS, S.; PRADHAN, C.; PILLAI, D. Dietary coriander (*Coriandrum sativum* L) oil improves antioxidant and anti-inflammatory activity, innate immune responses and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 132, p. 108486, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464822008269>. Acesso em: 6 abr. 2023.
- DAWOOD, M. A. O. et al. The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. *Aquaculture*, [s. l.], v. 523, p. 735205, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004484862030020X>. Acesso em: 4 abr. 2023.
- DE SOUZA, F. P. et al. Effect of β -glucan in water on growth performance, blood status and intestinal microbiota in tilapia under hypoxia. *Aquaculture Reports*, [s. l.], v. 17, p. 100369, 2020.
- ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 827–839, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X01000386>. Acesso em: 20 mar. 2023.

FIERRO-CASTRO, C. et al. Loss-of-function mutations in melanocortin-1 receptor modulate immune response in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 131, p. 838–846, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464822007409>. Acesso em: 24 mar. 2023.

GAO, F. et al. Nile tilapia TLR3 recruits MyD88 and TRIF as adaptors and is involved in the NF- κ B pathway in the immune response. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 218, p. 878–890, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813022016397>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GAO, F.-Y. et al. TLR1 in Nile tilapia: The conserved receptor cannot interact with MyD88 and TIRAP but can activate NF- κ B in vitro. *Developmental & Comparative Immunology*, [s. l.], v. 127, p. 104300, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X21003086>. Acesso em: 20 mar. 2023.

KOCH, J. F. A.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 112, p. 56–63, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821000450>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, [s. l.], v. 2, n. 10, p. 725–734, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri910>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LIANG, Y.; ZHOU, Y.; SHEN, P. NF- κ B and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol*, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 343–350, 2004.

MOHAMMADI, G. et al. Pistachio hull polysaccharide protects Nile tilapia against LPS-induced excessive inflammatory responses and oxidative stress, possibly via TLR2 and Nrf2 signaling pathways. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 121, p. 276–284, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821004587>. Acesso em: 23 mar. 2023.

NAIEL, M. A. E. et al. Gum Arabic-enriched diet modulates growth, antioxidant defenses, innate immune response, intestinal microbiota and immune related genes expression in tilapia fish. *Aquaculture*, [s. l.], v. 556, p. 738249, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848622003659>. Acesso em: 4 abr. 2023.

PALTI, Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental & Comparative Immunology*, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 1263–1272, 2011.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

REBOUÇAS, E. de L. et al. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, [s. l.], v. 56, p. 143–154, 2013.

REIS, I. C. dos et al. β -glucan mimics tissue damage signaling and generates a trade-off between head kidney and spleen to activate acquired immunity in vaccinated tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 117, p. 179–187, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821002254>. Acesso em: 27 mar. 2023.

RODRIGUES, F. S. et al. Sistema imune inato de peixes e o uso do alho como imunostimulante: revisão de literatura. *Research, Society and Development*, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e152943014–e152943014, 2020.

RÜNGELER, P. et al. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry*, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 2343–2352, 1999.

SALAH, A. S.; EL NAHAS, A. F.; MAHMOUD, S. Modulatory effect of different doses of β -1,3/1,6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 70, p. 204–213, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464817305193>. Acesso em: 6 abr. 2023.

SHAHABI, M. et al. Do fishways stress fish? Assessment of physiological and hydraulic parameters of rainbow trout navigating a novel W-weir fishway. *Ecological Engineering*, [s. l.], v. 169, p. 106330, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925857421001853>. Acesso em: 12 abr. 2023.

TRUNG, N. B. et al. Fish-specific TLR18 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) recruits MyD88 and TRIF to induce expression of effectors in NF- κ B and IFN pathways in melanomacrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 119, p. 587–601, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464821003661>. Acesso em: 12 abr. 2023.

WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIOUS, P. H. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, [s. l.], v. 248, n. 1–4, p. 217–225, 2005.

YILMAZ, S.; ERGÜN, S. Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 78, p. 140–157, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464818302195>. Acesso em: 6 abr. 2023.

YU, J. et al. Characterization of toll-like receptor 1 (TLR1) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 115, p. 27–34, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464821001467>. Acesso em: 12 abr. 2023.

ZHANG, J. et al. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways. *Fish & shellfish immunology*, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 380–388, 2014.

ZHENG, T. et al. Alleviative effects of Ginkgo biloba extract on oxidative stress, inflammatory response and immune suppression induced by long-term glyphosate exposure in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, [s. l.], v. 546, p. 737325, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848621009881>. Acesso em: 12 abr. 2023.

3 - CAPÍTULO 3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO β -GLUCANO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA DE DEFESA DE TILÁPIAS (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) EM SITUAÇÃO DE ESTRESSE

RESUMO

Substâncias como β -glucano podem atuar como PAMPs nos organismos dos peixes regulando positiva ou negativamente os genes do sistema imune, diminuindo a susceptibilidade às doenças, melhorando os índices zootécnicos com melhores ganhos de produção. O estudo desse capítulo avaliou a administração do β -glucano a 0,1% na dieta de tilápias-do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por 15 e 30 dias sob situações de estresse comum às pisciculturas como adensamento, perseguição e hipóxia, seguido do desafio com injeção intraperitoneal de *S. agalactiae* inativada. Os peixes foram divididos em 8 tratamentos com 3 repetições cada, em esquema fatorial com duas dietas (controle e β -glucano a 0,1%), dois períodos (15 e 30 dias) e o desafio (sem estresse e com estresse). Após cada período experimental 4 peixes de cada caixa (n=12) foram aleatoriamente capturados, anestesiados e sacrificados para coleta de rim cranial e baço. Foram então avaliados os seguintes genes do sistema imune: *interleucina 1 beta (il1 β)*, *interferon gama (ifn γ)*, *interleucina 6 (il6)*, *interleucina 10 (il10)*, *imunoglobulina m (igm)*, *lisozima (lys)*, *componente três do sistema complemento (c3)*, *citocromo C oxidase 2 (cox2)*, *proteína mixovírus-resistente (mx)* e *proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons (hsp70)*. Com os dados obtidos foi possível observar que a introdução do β -glucano promoveu efeitos benéficos no sistema imune dos peixes tratados tanto por 15 como por 30 dias.

Palavras-chave: β -Glucano. Tilápia. Estresse. *S. Agalactiae*. Sistema Imune.

ABSTRACT

Substances such as β -glucan can act as PAMPs in fish organisms, positively or negatively regulating the genes of the immune system, reducing susceptibility to diseases, improving zootechnical indexes with better production gains. The study in this chapter evaluated the administration of 0.1% β -glucan in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for 15 and 30 days under stress situations common to fish farming, such as crowding, persecution and hypoxia, followed by challenge with intraperitoneal injection of inactivated *S. agalactiae*. The fish were divided into eight treatments with three repetitions each, in a factorial scheme with two diets (control and 0.1% β -glucan), two periods (15 and 30 days) and the challenge (without stress and with stress). After each experimental period, 4 fish from each box (n=12) were randomly captured, anesthetized and sacrificed for collection of cranial kidney and spleen. The following genes of the immune system were then evaluated: *interleukin 1 beta* (*il1 β*), *interferon gamma* (*ifn γ*), *interleukin 6* (*il6*), *interleukin 10* (*il10*), *immunoglobulin M* (*igm*), *lysozyme* (*lys*), *component three of the complement system* (*c3*), *cytochrome C oxidase* (*cox2*), *myxovirus-resistant protein* (*mx*) and *70 kilodalton heat shock proteins* (*hsp70*). With the data obtained, it was possible to observe that the introduction of β -glucan promoted beneficial effects on the immune system of fish treated for both 15 and 30 days.

Keywords: β -Glucan. Tilapia. Stress. *S. Agalactiae*. Immune System.

3.1 Introdução

O crescimento da demanda por alimentos à base de peixes promoveu a intensificação dessa cultura para obtenção de melhores resultados na produção. Como consequência tem-se observado um aumento de agentes patogênicos e maior gravidade de doenças nesses animais, principalmente causados pelos estresses. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem apresentado boa aceitação no mercado nacional e, por suas características zootécnicas como alta taxa de reprodução e adaptação ao nosso clima, está sendo amplamente criada em praticamente todo o território. Os manejos constantes na tilapicultura como arrazoamentos, biometrias, vacinações e transportes provocam estresses aos peixes facilitando a invasão de agentes patogênicos como bactérias, vírus, parasitos e fungos.

O sistema imune dos peixes em geral não é tão evoluído como nos mamíferos, dependendo principalmente da imunidade inata, que é a primeira linha de defesa do organismo, mas também contam, em menor grau, com o sistema imune adaptativo (ELLIS, 2001). Possui barreiras físicas como escamas, muco e pele que dificultam a entrada ou mesmo eliminam potenciais patógenos. O primeiro ataque ocorre com o auxílio de componentes humorais como as proteínas da fase aguda da inflamação como o sistema complemento, lisozimas e citocinas (SOTO DÁVILA; LATIMER; DIXON, 2020b). Mecanismos de defesa mediados por células atuam principalmente por meio de neutrófilos e macrófagos com inúmeras atividades imune como produzir espécies reativas de oxigênio capazes de destruir os microrganismos (ELLIS, 1999). Os principais tecidos linfóides de peixes são o rim cranial, o baço e tecidos associados à mucosa que possuem células pluripotentes precursoras, que irão produzir células de defesa. Algumas das bactérias que mais têm afetado a piscicultura nacional são *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. e *Enterococcus* sp. que podem produzir perdas econômicas de grande monta. Estreptococose geralmente ocorre nos meses de verão com temperatura da água mais quente e a principal via de transmissão é a oral. Muitas vezes os sintomas são agudos e sistêmicos pois a bactéria tem tropismo pelo sistema nervoso central, causando meningoencefalite apresentando sinais neurológicos como nadar em círculos, podendo também apresentar panoftalmite e exoftalmia. Se o animal não morre a doença pode cronicar apresentando caquexia, formação de abscessos inflamatórios e flegmões na musculatura.

A fim de evitar doenças e estresse desnecessário aos peixes e também diminuir os resíduos de medicamentos nos produtos de consumo humano, direcionamos nossos estudos na promoção da modulação do sistema imune com o uso do β -glucano, substância capaz de estimular o sistema imune não específico dos peixes, inclusive de tilápias-do-Nilo (LU *et al.*, 2019), promovendo uma ação pluripotente, pois há estudos evidenciando ações imunomoduladora, anti-infecciosa e anti-inflamatórias do produto, e que também tem capacidade de aumentar as concentrações de anticorpos e estimular a atividade dos macrófagos (CASTRO *et al.*, 1999a). Os extratos de β -glucano com estrutura composta por cadeia principal com unidades de glicose com ligação β 1-6 e cadeias laterais com ligações β 1-3 facilitam a estimulação dos mecanismos de defesa não específica dos animais, incluindo os peixes (ROBERTSEN *et al.*, 1990b), sendo esse o mais utilizado como aditivos alimentares para organismos aquáticos (SAKAI, 1999; VALLEJOS-VIDAL *et al.*, 2016).

Entretanto, um modo de ação conclusivo dos β -glucanos que resultam nos efeitos imunomodulatórios sobre o organismo ainda não foi descrito, assim ainda persiste a questão se a ação sistêmica resultante desse imunoestimulante decorre de sua ação direta sobre os leucócitos ou indiretamente sobre as populações microbianas no intestino, bem como se há uma ação sobre os mecanismos de imunidade de mucosa (DALMO; BØGWALD, 2008; VALLEJOS-VIDAL *et al.*, 2016).

Sabendo que doses excessivas de imunoestimulantes podem provocar imunossupressão (VIJAYARAM *et al.*, 2022), o presente estudo visou identificar a necessidade da suplementação com β -glucano por períodos de 15 ou de 30 dias para promover a imunomodulação em juvenis de tilápia do Nilo frente a situações de estresse de manejo que ocorrem em condições intensivas de criação.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desse capítulo são avaliar se a administração de β -glucano à tilápias por 15 ou 30 dias, frente a situações de estresse de manejo:

- Melhora as respostas imunológicas e
- Ativa os mecanismos de transcrição de genes do sistema imune.

3.3 Materiais e Métodos

Os materiais e métodos deste capítulo foram semelhantes aos do capítulo anterior, conforme descrito resumidamente abaixo

3.3.1 Instalações, animais e dietas

O experimento foi realizado no biotério do Laboratório de Imunologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Câmpus de Dracena, São Paulo. Foram utilizadas 24 caixas de polietileno tampadas com telas. O sistema de água foi aberto com renovação constante e a temperatura mantida a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$. O local não tinha iluminação natural então havia lâmpadas frias para controle do fotoperíodo (12h luz/ 12h escuro).

Foram utilizadas 408 tilápias juvenis, revertidas, provenientes de piscicultura da região de Santa Fé do Sul - SP, com o peso inicial médio de 80g. Os peixes foram distribuídos em 24 caixas, (17 peixes/ caixa) e alimentados durante o período de aclimação (3 semanas) com dieta comercial. Após a aclimação o experimento foi iniciado.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais, no dia 12/07/2018, registrada com o nº: 16/2018R1- CEUA.

No presente experimento, foram elaboradas duas dietas: Dieta controle (livre de β -glucano) e dieta experimental (dieta controle acrescida de 0,1% de β -glucano, ambas preparadas no Instituto de Pesca de São José do Rio Preto SP formuladas de acordo com as exigências da espécie (Tabela 1) (DE BRITO *et al.*, 2021; KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021).

3.3.2 Delineamento experimental

As 408 tilápias foram distribuídas em 24 caixas de polietileno de 100 L com 17 peixes cada, divididas em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2$, com 3 repetições cada.

Tratamento 1 (C15). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 dias de experimento.

Tratamento 2 (C15D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas aos 14 dias, e foram amostradas após 15 dias de experimento.

Tratamento 3 (β 15). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 dias de experimento.

Tratamento 4 (β 15D). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas aos 14 dias, e foram amostradas após 15 dias de experimento.

Tratamento 5 (C30). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Tratamento 6 (C30D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram desafiadas aos 29 dias, e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Tratamento 7 (β 30). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Tratamento 8 (β 30D). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 30 dias e foram desafiadas aos 29 dias, e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Os tratamentos “C15D e β 15D” e “C30D e β 30D” foram desafiados com manejos estressantes (estresse e infecção com $1,0 \times 10^8$ UFC de *S. agalactiae*/peixe inativada) aos 14 e 29 dias, respectivamente, e amostrados após 24 horas. Para as amostragens foram capturados aleatoriamente 4 peixes de cada caixa (n=12/tratamento), sedados em solução de óleo de cravo (1 g 10 L⁻¹ de água), submetidos à coleta de sangue pela veia caudal, para avaliação de análises hematológicas e imunológicas. Depois foram eutanasiados por deslocamento cervical e procedido a coleta de órgãos (rim cranial e baço) utilizados na avaliação da expressão de genes do sistema imune.

3.3.3 Desafio de estresse e infecção experimental

Para a fase final do experimento, foi desenvolvido um protocolo de desafio microbiológico com *S. agalactiae*. As bactérias foram adquiridas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (LAPOA-CAUNESP), cujas cepas foram isoladas e identificadas em peixes a partir de sinais clínicos do animal doente. Para a realização do desafio, utilizou-se as bactérias que cresceram em meio de cultivo BHI, em densidade óptica alta, em torno de 2 (Leitura em 625 nm) que passaram por inativação feita por aquecimento em garrafa em banho maria à 50°C por 30 min.

O desafio de estresse consistiu em simular alguns manejos ou episódios que são comuns no cultivo de tilápias. Para tal, os peixes dos tratamentos “C15D e β 15D” e “C30D e β 30D” aos 14 e 29 dias de experimento, respectivamente, passaram por 12 horas de adensamento, produzido pela diminuição de metade do volume de água da caixa. Os peixes sofreram perseguição por 10 minutos e exposição aérea por 3 minutos, repetidos no período da manhã e da tarde. Em seguida, foram inoculados, por injeção intraperitoneal de 100 μ L por 10g de peso vivo de suspensão de *S. agalactiae* inativada na concentração de $1,3 \times 10^8$ UFC/ mL⁻¹ na cavidade pélvica dos peixes.

3.3.4 Análises biologia molecular

O rim cranial e o baço foram coletados de acordo com cada protocolo experimental e armazenados em freezer -80°C até a realização das análises. O material passou por extração do RNA para análise da expressão dos genes do sistema imune *il1 β* , *igm*, *ifn γ* , *il6*, *il10*, *lys*, *c3*, *cox2*, *mx* e *hsp70*.

A extração de RNA das amostras foi obtida com a utilização de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em equipamento que determina a quantidade de RNA em nanogramas (ng) (Nanodrop). A partir do RNA extraído, componente que apresenta pouca estabilidade, foi obtido o cDNA por transcrição reversa (RT) sintetizado pelo script™.

Em seguida a sequência foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase

(PCR), utilizando os primers desenhados (selecionados em literatura para a espécie *Oreochromis niloticus*) (Tabela 2), dNTPs e enzima DNA polimerase de Taq. (iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)). A reação de amplificação foi realizada em equipamento termociclador de RT-PCR, que proporcionou os ciclos de temperatura necessários para desnaturação do DNA (alta temperatura, normalmente em torno de 95°C), hibridação dos primers com o DNA template (temperatura baixa, em torno de 48°C) e temperatura mediana (em torno de 68°C) ponto ótimo da polimerase, que irá incorporar os dNTPs para a extensão das fitas. As temperaturas para os ciclos desnaturação-hibridização-síntese resultaram na síntese de centenas de milhões de cópias do fragmento de DNA amplificado. O limiar da fase exponencial da reação é detectado durante os ciclos de temperatura e é denominado de Cycle Threshold (Ct), a partir do qual se quantifica exatamente os produtos da reação de amplificação devido à emissão de fluorescência (Sybr Green™ e o Taqman™ são os fluoróforos mais utilizados). O equipamento apresenta um termociclador e sistema óptico para a excitação da fluorescência, além de softwares para analisar as informações resultantes. A fluorescência emitida representa a quantidade do produto amplificado e aumenta de acordo com o resultado da reação, e a fim de avaliar o transcriptoma, avalia-se através de programas computacionais qual tratamento promoveu maior amplificação do RNAm (“fold-change”). Os resultados foram analisados por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (PFAFFL, 2001).

Os primers β -actin-B (β actina) e EF-1 α _A (Elongator factor) foram utilizados como genes de referência para normalizar os dados dos genes específicos. Genes de referência ou manutenção (housekeeping) podem ser utilizados como normalizadores da qPCR-RT, pois eles são expressos em células e tecidos, e não apresentam alterações na sua expressão, mesmo sob condições experimentais (REBOUÇAS *et al.*, 2013). Os grupos controles nos dois períodos foram utilizados como modelo para calcular o aumento da expressão gênica nos demais grupos. Os primers específicos utilizados nesse experimento estão listados abaixo (Quadro 2)

Quadro 2 - Sequência de primers do capítulo 3

Gene	Sequência Fw/Rv (5'-3')	B	a	Número de acesso	Referência
<i>B actina b</i>	F: GTGCCCATCTACGAGGGTTA R: CTCTTTGATGTCACGCACGA	56		KJ126772	Mahmoud A. O. Dawood <i>et al.</i> 2020
<i>ef-1α_a</i>	F: ATCAAGAAGATCGGCTACAACCCT R: ATCCCTTGAACCAGCTCATCTTGT	09	0°C	AB075952.1	Dong-Liang Lu <i>et al.</i> 2019.
<i>il1β_b</i>	F: ATTGTCGTCCTGTCTATC R AATGTCATCATGGTATTGC	6		XM_005457887.3	Jing Wang <i>et al</i> 2019.
<i>igm heavy chain</i>	F: TGACCACATCGTTCAGAGCA R: GGCGACCTTAGCCTTTGT	28	8°C	NM_001287402.1	Chen <i>et al.</i> 2016.
<i>ifny</i>	F: ACAGAGGAGGCGGAGATG R: GCAGTGCTTCGGGATAGAG	65		XM_019350387	Jing Wang <i>et al.</i> 2019.
<i>il6</i>	F: ACAGAGGAGGCGGAGATG R: GCAGTGCTTCGGGATAGAG	65		XM_019350387	Jing Wang <i>et al</i> 2019
<i>il10</i>	F: CAGCAGCAGGAGCATCAGCATT R: CACAGGAGGACGGTCTGAGAAGT	07		KP645180.1	Ignacio <i>et. al</i> , 2005.
<i>c-type lysozyme</i>	F: AAGGGAAGCAGCAGCAGTTGTG R: CGTCCATGCCGTTAGCCTTGAG	51		XM_003460550.2	J. Qiang <i>et al.</i> 2016.
<i>c3</i>	F: GGTGTGGATGCACCTGAGAA R: GGGAAATCGGTACTTGGCCT	63		XM_013274267.2	Rui Jia <i>et al.</i> 2019.
<i>cox2</i>	F: TGCTGAAAGAGGTCCACCCATACT R: CACTGAGATGCTGCACGTAGTC	17	0°C	XM_003445052	Dong-Liang Lu <i>et al.</i> 2019.
<i>mx</i>	F: GGATCCTGATGGAGAGAGGA R: GCATTTGACCACCATGTAGC	36		XM_025907419.1	Abdallah S. Salah <i>et al.</i> 2017.
<i>hsp70</i>	F: CATCGCCTACGGTCTGGACAA R: TGCCGTCTTCAATGGTCAGGAT	07		FJ207463.1	J. Qiang <i>et al.</i> 2016.

Fonte: Elaborado pela autora

3.3.5 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância adotado de 5%, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.4 M7.

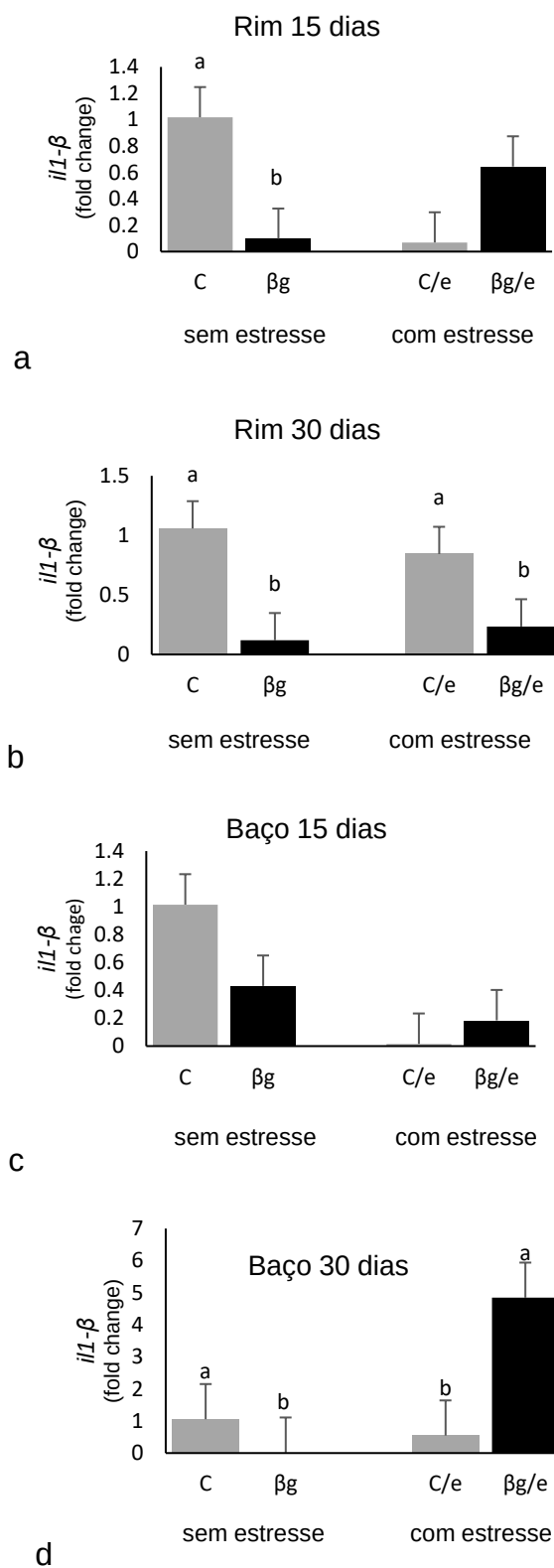
3.4 Resultados e Discussão

Neste item serão apresentados os resultados e as discussões relativas aos dados obtidos no experimento, com a metodologia acima descrita.

3.4.1 Expressão relativa do gene *interleucina 1 beta (il1 β)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Neste experimento observamos que a adição de β -glucano na dieta provocou diminuição da expressão do gene *il1 β* nos dois órgãos e nos dois períodos, mas a presença de estresse estimulou o aumento do gene em 15 dias nos dois órgãos e em 30 dias no baço. No rim, os peixes tratados por 30 dias com o imunoestimulante, a expressão do gene teve evidente queda (figura 11). Efeitos semelhantes foram vistos em 15 dias de suplementação e estresse com as mesmas espécies (REIS *et al.*, 2021). Experimento com 3 concentrações de β -glucano por 8 semanas mostrou que 0,5 e 1% do produto provocaram aumento da expressão desse gene, mas a infecção como *A. salmonicida* diminuiu os valores em barbos (*Tor putitora*) (AKHTAR, M.S. *et al.*, 2021a). Em experimento utilizando o imunoestimulante “Goma Arábica” foi observado o aumento da expressão de *il1 β* e *il10* em rim cranial e baço de tilápias (NAIEL, M. A. E. *et al.*, 2022). Tilápias alimentadas com β -glucano apresentaram diminuição da expressão de *il1 β* em alta densidade de animais (DAWOOD, Mahmoud AO *et al.*, 2020). Em estudo utilizando milho contaminado com aflatoxina na ração das tilápias foi demonstrado que a adição de 0.5% e 1% extrato de sementes de Moringa oleifera diminui a expressão dos genes *cox2* e *il1 β* , indicando supressão da resposta inflamatória frente ao estresse (ABDELHIEE *et al.*, 2021).

Figura 11 - Expressão relativa do gene *il1 β* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



Legenda: a, b – rim; c, d - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$.

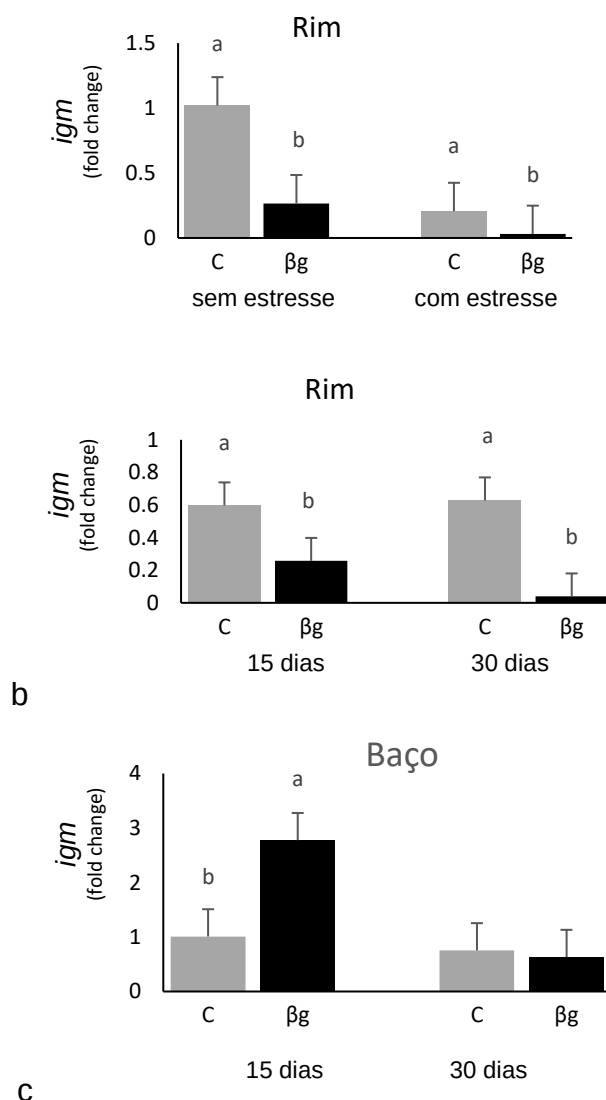
C= dieta controle, β g= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.2 Expressão relativa do gene da *imunoglobulina m (igm)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

No rim cranial observamos diminuição da expressão do gene *igm* tanto em 15 como com 30 dias nos peixes tratados com o probiótico, em relação à dieta controle, assim como quando sofreram o desafio. No baço houve aumento da expressão de *igm* em 15 dias de tratamento com o β -glucano (Figura 12). Em outro experimento também com tilápias tratadas β -glucano apresentaram aumentos plasmáticos de *igm* quando desafiadas com o mesmo patógeno (DOU *et al.*, 2023).

Figura 12 - Expressão relativa do gene *igm* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



Legenda: a, b- rim cranial, c - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$.

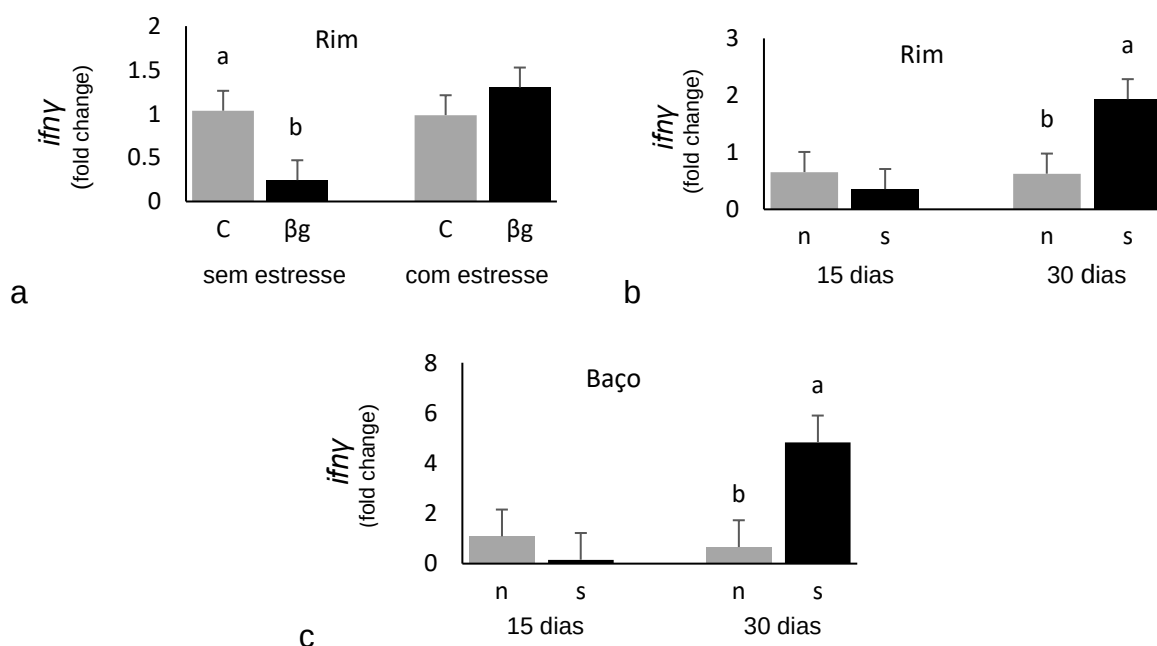
C= dieta controle, β g= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.3 Expressão relativa do gene *interferon gama (ifny)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Neste experimento observamos que tanto em rim cranial como em baço o estresse provocou diminuição da expressão do gene *ifny* em 15 dias e aumentos em 30 dias e, comparando as dietas, vimos que no rim cranial o uso do β -glucano também diminuiu a expressão, mas os fatores de estresse estimularam aumentos do gene (Figura 13). Em outro ensaio, peixes dessa mesma espécie alimentado com β -glucano ou *Lactobacillus plantarum* L-137 tiveram grande aumento da expressão de *ifny* com o primeiro imunoestimulante, mas frente ao desafio com *Aeromonas hydrophila* a expressão não apresentou diferenças em relação ao grupo que recebeu dieta controle (DAWOOD, Mahmoud A. O. *et al.*, 2020). Semelhante aos nossos achados, a adição de 1% de β -glucano a peixes barbos (*Tor putitora*) desafiado como *A. salmonicida* mostrou aumentos significativa nesse gene, comparado à dieta controle (AKHTAR, M.S. *et al.*, 2021b). Tilápias desafiadas com deltametrina (15 μ g/L) tiveram aumentos significantes da expressão do gene *ifny*, independente da adição de β -glucano na dieta (DAWOOD, Mahmoud A.O. *et al.*, 2020b). Clorpirifós provocou aumento na expressão de *ifny* em fígado de tilápias e, quando foram suplementadas com β -glucano, os valores foram maiores (DAWOOD, Mahmoud AO *et al.*, 2020).

Figura 10 - Expressão relativa do gene *ifny* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



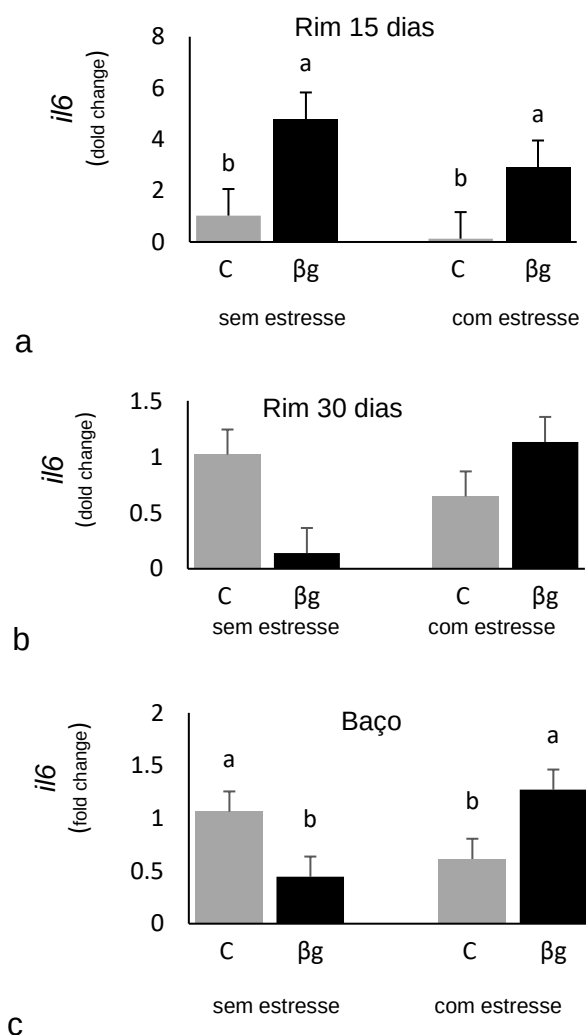
Legenda: a, b - rim cranial; c - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$
C= dieta controle, β g= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.4 Expressão relativa do gene *interleucina 6* (*il6*) em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Neste experimento pudemos observar que a expressão do gene *il6* em rim cranial dos peixes alimentados por 15 dias com β -glucano apresentaram aumentos tanto com ou sem o desafio, mas em 30 dias as diferenças não foram significativas. No baço esse desafio também provocou aumentos da expressão do gene nos peixes com a dieta suplementada, em relação à dieta controle (Figura 14). Similares efeitos foram observados por REIS *et al.* (2021) em trabalho também com tilápias e uso do β -glucano.

Figura 14 - Expressão relativa do gene *il6* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



Legenda: a, b- rim cranial; c - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$.

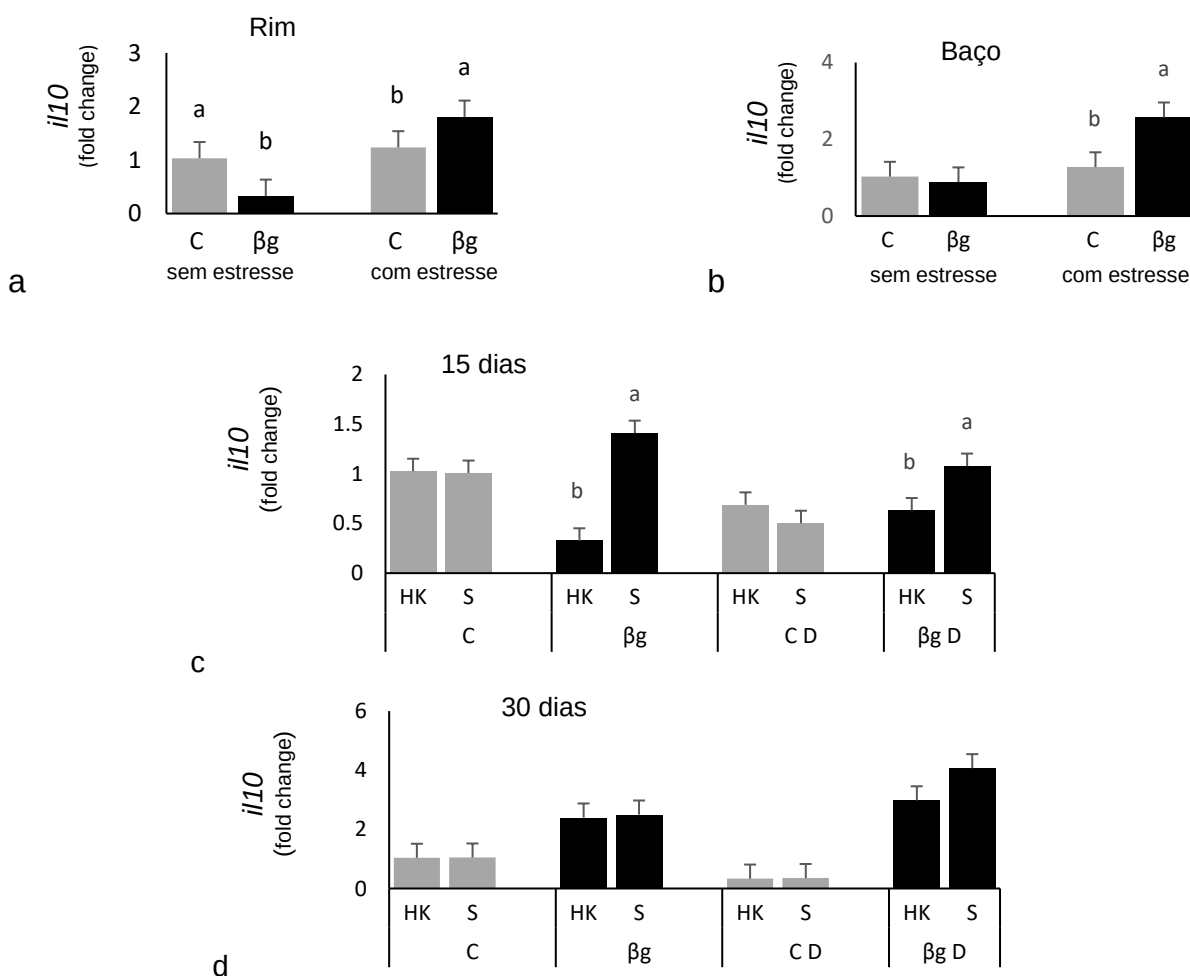
C= dieta controle, β g= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.5 Expressão relativa do gene *interleucina 10* (*il10*) em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Nos dois órgãos observamos diminuição da expressão do gene *il10* nos peixes alimentados com β -glucano, mas, quando eles foram desafiados, mostraram aumentos significativos desse gene (Figura 15 a, b). A comparação entre os órgãos estudados, mostrou que no baço de animais suplementados por 15 dias os valores de *il10* foram maiores do que em rim cranial (Figura 15 c, d). AKHTAR (2021b) demonstrou que a adição de diferentes concentrações de β -glucano na dieta de peixes barbo (*Tor putitora*) não alterou a expressão do gene *il10* em relação aos que receberam dieta controle, porém, quando desafiados com *A. salmonicida* a expressão desse gene teve grande queda com 1,0 e 1,5% do probiótico.

Figura 11 - Expressão relativa do gene *il10* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

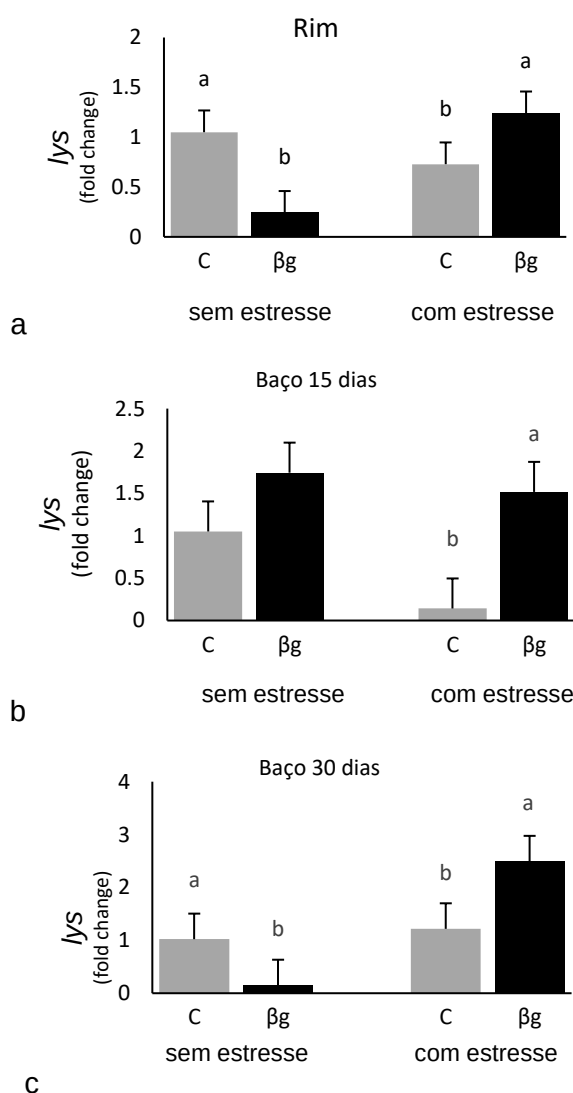


Legenda: a - rim cranial; b - baço; c, d - comparação entre os órgãos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$. C= dieta controle, βg= dieta β -glucano, D= desafio, HK- rim cranial, S- baço. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.6 Expressão relativa do gene *lisozima (lys)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Observamos que a adição de β -glucano, provocou diminuição da expressão do gene *lys* em rim cranial comparado à dieta controle, mas, quando foram estressados essa expressão apresentou aumentos significativos do gene. Em baço nos animais desafiados foi observado expressão semelhante (Figura 16). O gene *lys* em rim cranial e a proteína lisozima em tilápias também apresentaram aumento quando alimentados por 15 dias com β -glucano e com 30 dias de suplementação e vacinação, porém no baço esse experimento não observou alterações (REIS *et al.*, 2021a).

Figura 12 - Expressão relativa do gene *lys* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



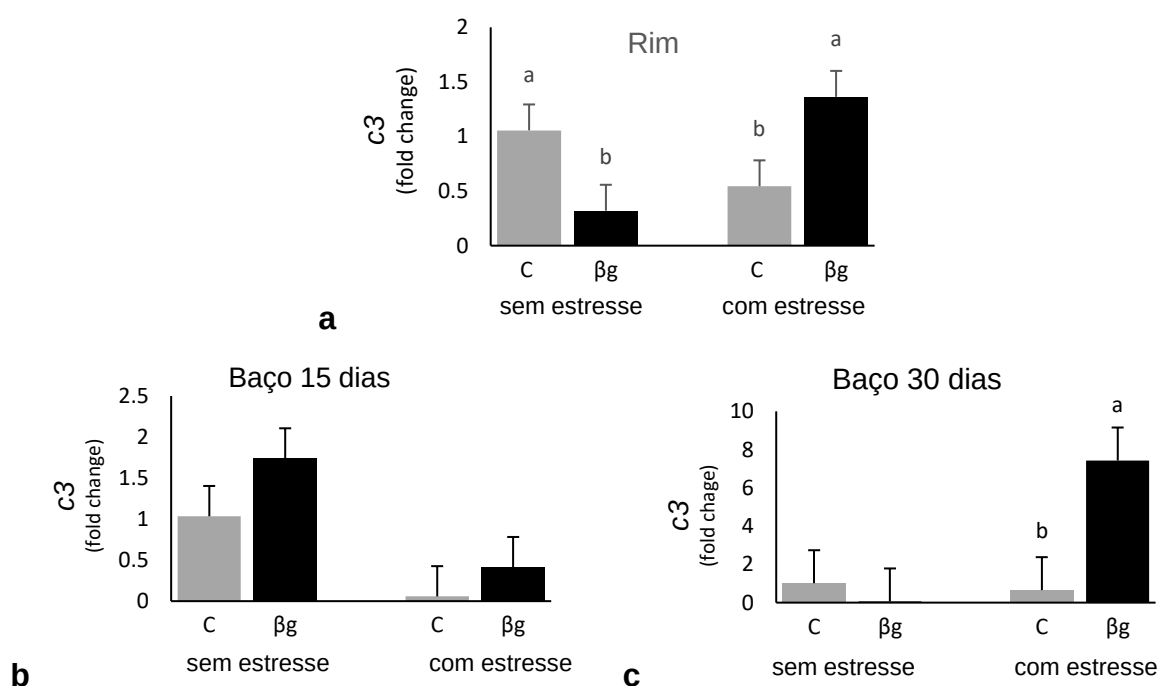
Legenda: a rim cranial; b, c baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. P < 0.05
C= dieta controle, β g= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.7 Expressão relativa do gene *componente três do complemento (c3)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Neste trabalho foi utilizado o gene do componente c3 do sistema complemento e observamos que a suplementação de β -glucano nos animais desafiados mostrou aumento da expressão do gene em relação à dieta controle em rim cranial independente do período analisado, mas, no baço, esse aumento foi observado apenas com 30 dias de tratamento (Figura 17). Peixes *Tilapia zilli* tratados 8 semanas com 0,5, 1,0 e 1,5% de β -glucano apresentaram aumentos significativos do gene c3, enquanto ao serem desafiados com *A. salmonicida*, o aumento só ocorreu com 0,5% do aditivo (AKHTAR, M.S. *et al.*, 2021b).

Figura 13 - Expressão relativa do gene c3 em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



Legenda: a rim cranial; b, c baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$
C= dieta controle, β g= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

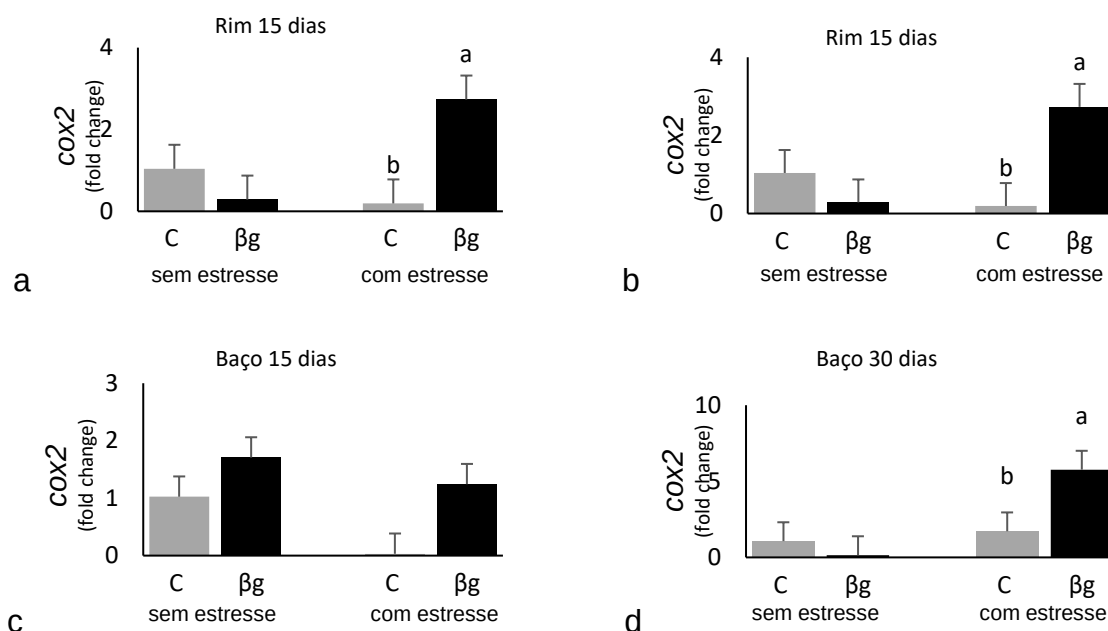
Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.8 Expressão relativa do gene *ciclo-oxigenase dois (cox2)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Este experimento mostrou que a suplementação de β -glucano aos grupos de peixes sem desafio não apresentaram diferenças significativas na expressão genica de *cox2* nos dois órgãos e nos dois períodos estudados. Porém, após o desafio, em quinze dias no rim cranial e em trinta dias no baço, a expressão foi bastante

aumentada nos peixes que receberam probiótico, mostrando também uma resposta mais tardia no baço (Figura 18). Trabalho com o mesmo imunoestimulante e espécie de peixe, suplementadas por 5 semanas e 3 dias após desafio com *A. hydrophila* apresentou aumento da expressão desse gene no fígado e diminuição no baço, mas no rim cranial não mostrou diferenças significativas, em relação aos animais que receberam dieta controle (LU. *et al.*, 2019). Análise de expressão genica em tilápias infectadas com *S. agalactiae* mostrou diminuição da expressão de *cox2* no baço (WU *et al.*, 2019). Grupo de tilápias suplementadas com extrato da semente de Moringa oleífera tiveram diminuição da expressão do gene *cox2* comparado à dieta controle, indicando supressão da resposta inflamatória (ABDELHIEE *et al.*, 2021). Outra análise em baço de tilápias mostrou que esse gene não mostrou alterações, após adição de taurina na dieta, enquanto no rim cranial houve aumento da expressão (PENG *et al.*, 2022). A expressão de *cox2* em leucócitos de rim cranial de robalos europeu alimentados por 30 dias com probióticos *B. velezensis* e desafiados com LPS (lipopolissacarídeos) de *V. anguillarum* só apresentaram aumento significativo da expressão do gene em 72 horas após desafio (MONZÓN-ATIENZA *et al.*, 2022).

Figura 14 - Expressão relativa do *cox2* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



Legenda: a, b- rim cranial; c, d - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$.

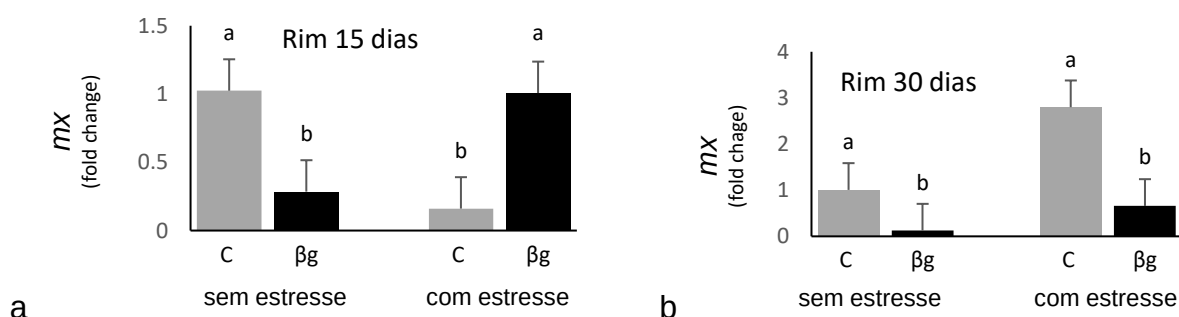
C= dieta controle, βg= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte:

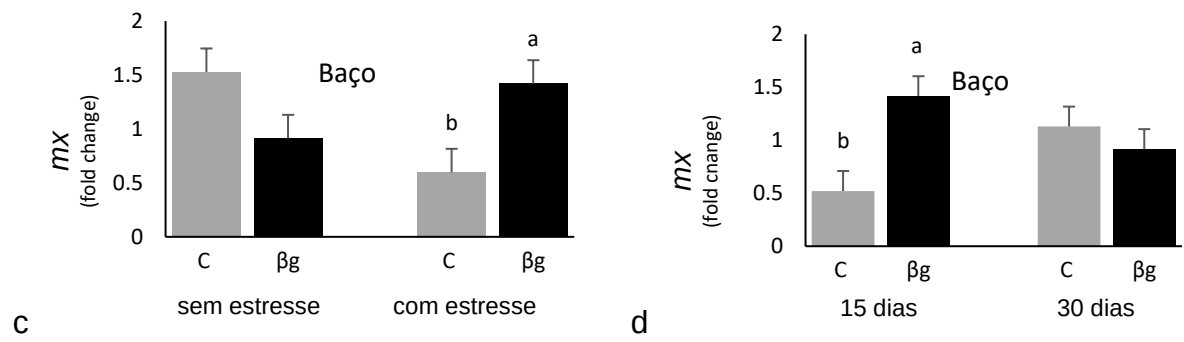
Elaborado pela autora.

3.4.9 Expressão relativa do gene da *proteína mixovírus resistance (mx)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Observamos que a adição de β -glucano na dieta dos peixes diminuiu a expressão do gene *mx* em rim cranial nos dois períodos e em baço apenas em 15 dias. Ainda no primeiro período de suplementação o estresse provocou aumento consistente da expressão nos dois órgãos e em 30 dias apresentou grande queda, mas diferenças significativas foram observadas apenas em rim cranial (Figura 19). Em ensaio também com tilápias, mas com três doses diferentes de β -glucano, a concentração a 1% estimulou o *mx* apenas 36 horas após o desafio, permanecendo alta por até 10 dias (SALAH; EL NAHAS; MAHMOUD, 2017). *In vitro* foi mostrado que *ifn γ* recombinante de tilápia foi capaz de estimular a expressão do gene *mx* em cultura de células primárias de rim cranial (VELÁZQUEZ *et al.*, 2017). Em salmão do Atlântico desafiados com *Vibrio bacterina* em 10x a concentração original (AquaHealth Ltd., Charlottetown, Canada) ocorreu aumento da expressão do *mx* no dia 1 após a injeção com pico em 3 dias (ACOSTA *et al.*, 2004). Em salmão a suplementação de β -glucano por 30 dias não apresentou diferenças na expressão de *mx* no rim cranial, mas, quando em situação de hipóxia aguda o aditivo preveniu o decréscimo desse gene, auxiliando a imunidade dos animais. *mx* foi também observado em vários órgãos como rim, fígado e baço após estimulação por vírus IHNV e poli I:C (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Figura 15 - Expressão relativa do gene *mx* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



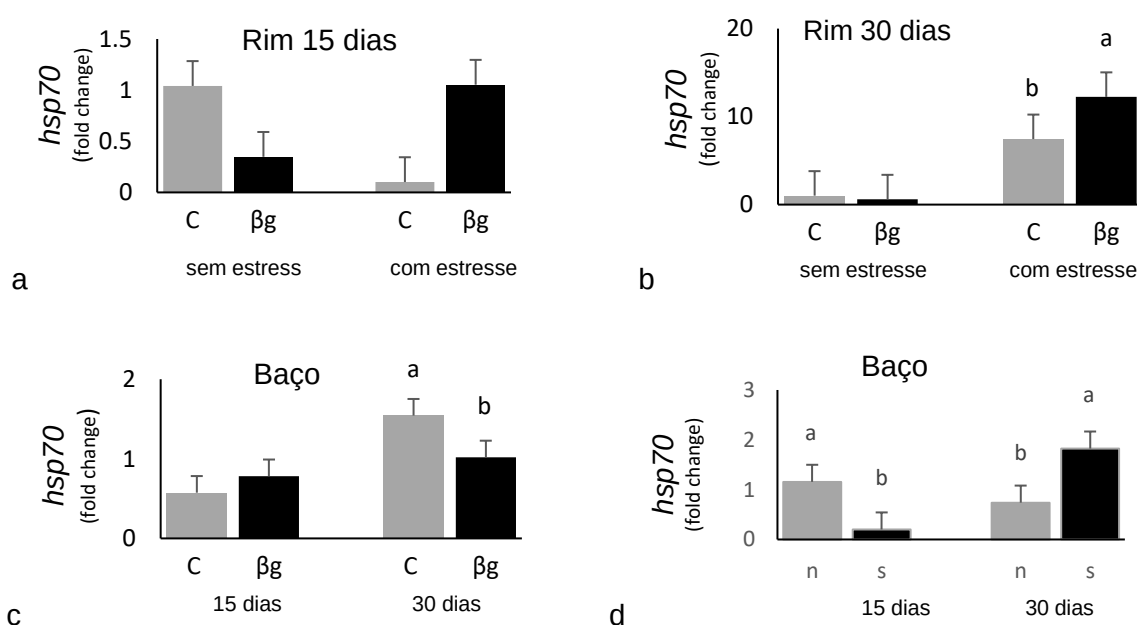


Legenda: a, b - rim cranial; c, d - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas.
 $P < 0.05$ C= dieta controle, βg = dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.
 Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.10 Expressão relativa do gene *proteína de choque térmico 70 (hsp70)* em rim e baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.

Nos peixes alimentados por 30 dias com β -glucano e depois desafiados observamos o aumento da expressão do gene *hsp70* em rim cranial. No baço, independente das dietas, o desafio mostrou queda da expressão em 15 dias e aumentos em 30 e, analisando a apenas as dietas, foi visto que a adição do β -glucano promoveu diminuição desse gene em 30 dias de tratamento (Figura 20). Semelhante aos nossos resultados Reis *et al.* (2021) observou que no rim cranial as respostas foram mais altas que no baço. O β -glucano e a vacinação provocaram estímulo suficiente para que *hsp70* fosse expresso no rim cefálico dos peixes do presente estudo. Estudo realizado por Salah; El Nahas; Mahmoud (2017) utilizando concentração de 0,1% e 0,2% de β -glucano mostrou que ambas as doses aumentaram a resposta do gene, mas o grupo com β -glucano a 0,1% apresentou aumento da expressão com 1 e 3 dias após desafio com *Streptococcus iniae*, e o grupo com 0,2% apresentou esse aumento apenas em 1 dia e ainda foram resultados menos expressivos que os anteriores.

Figura 16 - Expressão relativa do gene *hsp70* em rim e baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



Legenda: a, b - rim cranial, figura12 c, d - baço. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$ C= dieta controle, β g= dieta β -glucano. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.11 Análise de correlação

Nesse experimento a análise de correlação mostrou várias interações positivas entre as expressões de alguns genes relacionados ao sistema imune estudados nesse experimento (tabelas 4 e 5) como por exemplo do *ifn γ* com *il10*, *lys*, *c3*, *cox* e *hsp70*; da *il10* com *lys*, *c3*, *cox2* e *hsp70* no rim cranial e, no baço o gene de *ifn γ* apresentou com *il6*, *il10*, *lys*, *c3* e *cox2*. Isso nos mostra, em parte, a complexidade do sistema imune dos peixes.

Tabela 4 - Correlação da expressão de genes em rim cranial de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo

Rim Cranial	<i>il1β</i>	<i>igm</i>	<i>ifnγ</i>	<i>il6</i>	<i>il10</i>	<i>lys</i>	<i>c3</i>	<i>cox2</i>	<i>mx</i>	<i>hsp70</i>
<i>il1β</i>	1,00	0,71	0,43	-0,26	0,29	0,41	0,26	0,19	0,55	0,08
<i>igm</i>		1,00	0,03	0,03	-0,11	0,10	0,06	-0,32	0,09	-0,34
<i>ifnγ</i>			1,00	-0,14	0,92	0,84	0,73	0,78	0,56	0,74
<i>il6</i>				1,00	-0,18	-0,22	-0,01	-0,13	-0,14	-0,18
<i>il10</i>					1,00	0,89	0,76	0,81	0,50	0,86
<i>lys</i>						1,00	0,85	0,67	0,53	0,75
<i>c3</i>							1,00	0,57	0,30	0,70
<i>cox2</i>								1,00	0,74	0,83
<i>mx</i>									1,00	0,42
<i>hsp70</i>										1,00

Valores em negrito apresentam boa correlação entre os genes. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 - Correlação da expressão de genes em baço de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo

Baço	<i>il1β</i>	<i>igm</i>	<i>ifnγ</i>	<i>il6</i>	<i>il10</i>	<i>lys</i>	<i>c3</i>	<i>cox2</i>	<i>mx</i>	<i>hsp70</i>
<i>il1β</i>	1,00	-0,26	0,82	0,71	0,81	0,71	0,95	0,90	0,51	0,39
<i>igm</i>		1,00	-0,31	-0,02	-0,17	0,24	-0,18	-0,11	0,28	-0,29
<i>ifnγ</i>			1,00	0,78	0,91	0,73	0,78	0,90	0,58	0,46
<i>il6</i>				1,00	0,81	0,81	0,67	0,79	0,80	0,57
<i>il10</i>					1,00	0,83	0,85	0,89	0,69	0,60
<i>lys</i>						1,00	0,75	0,84	0,87	0,42
<i>c3</i>							1,00	0,91	0,58	0,42
<i>cox2</i>								1,00	0,70	0,39
<i>mx</i>									1,00	0,47
<i>hsp70</i>										1,00

Valores em negrito apresentam boa correlação entre os genes. Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Conclusão

Concluimos que o estresse altera o sistema imune das tilápias e a adição de β -glucano mostrou importantes imunomodulações tanto em 15 como em 30 dias. Foi ilustrado que as células imunes possuem receptores para β -glucano que facilitam a passagem dessas moléculas para dentro das células iniciando o processo de destruição dos agentes agressores (DAWOOD, Mahmoud AO *et al.*, 2020). No entanto, a imunidade pode ser prejudicada devido à desafios nas células imunes que enfraquecem sua atividade e causam imunossupressão.

3.6 Referências

ABDELHIEE, E. Y. *et al.* The impact of *Moringa oleifera* on the health status of Nile tilapia exposed to aflatoxicosis. **Aquaculture**, [s. l.], v. 533, p. 736110, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848620316434>. Acesso em: 6 abr. 2023.

ACOSTA, F. *et al.* Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 255–263, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464804000233>. Acesso em: 20 mar. 2023.

AKHTAR, M. S. *et al.* β -glucan modulates non-specific immune gene expression, thermal tolerance and elicits disease resistance in endangered *Tor putitora* fry challenged with *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 119, p. 154–162, 2021a. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464821003041>. Acesso em: 4 abr. 2023.

AKHTAR, M. S. *et al.* β -glucan modulates non-specific immune gene expression, thermal tolerance and elicits disease resistance in endangered *Tor putitora* fry challenged with *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 119, p. 154–162, 2021b. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464821003041>. Acesso em: 6 abr. 2023.

CASTRO, R. *et al.* Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 529–541, 1999.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. β -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & shellfish immunology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 384–396, 2008.

DAWOOD, M. A. *et al.* The influence of dietary β -glucan on immune, transcriptomic, inflammatory and histopathology disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & shellfish immunology**, [s. l.], v. 98, p. 301–311, 2020.

DAWOOD, Mahmoud A.O. *et al.* The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. **Aquaculture**, [s. l.], v. 523, p. 735205, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004484862030020X>. Acesso em: 6 abr. 2023.

DAWOOD, Mahmoud A. O. *et al.* The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. **Aquaculture**, [s. l.], v. 523, p. 735205, 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484862030020X>. Acesso em: 21 mar. 2023.

DE BRITO, J. M. *et al.* Top-spraying xylanase and β -glucanase improves digestible energy content and optimizes protein and amino acids digestibility in high-fiber diet fed to growing Nile tilapia. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], v. 278, p. 114991, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840121001772>. Acesso em: 4 abr. 2023.

DOU, X. *et al.* Effects of dietary β -glucan on growth rate, antioxidant status, immune response, and resistance against *Aeromonas hydrophila* in genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, [s. l.], v. 29, p. 101480, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513423000194>. Acesso em: 23 mar. 2023.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 291–308, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464898901929>. Acesso em: 20 mar. 2023.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 827–839, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X01000386>. Acesso em: 20 mar. 2023.

KOCH, J. F. A.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 112, p. 56–63, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821000450>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LU, D.-L. *et al.* The comparisons in protective mechanisms and efficiencies among dietary α -lipoic acid, β -glucan and L-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 86, p. 785–793, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464818308222>. Acesso em: 20 mar. 2023.

MONZÓN-ATIENZA, L. *et al.* Dietary supplementation of *Bacillus velezensis* improves *Vibrio anguillarum* clearance in European sea bass by activating essential innate immune mechanisms. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 124, p. 244–253, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464822001589>. Acesso em: 6 abr. 2023.

NAIEL, M. A. E. *et al.* Gum Arabic-enriched diet modulates growth, antioxidant defenses, innate immune response, intestinal microbiota and immune related genes

expression in tilapia fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 556, p. 738249, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848622003659>. Acesso em: 4 abr. 2023.

PENG, L. *et al.* Taurine promotes *Oreochromis niloticus* survival against *Edwardsiella tarda* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 129, p. 137–144, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105046482200540X>. Acesso em: 6 abr. 2023.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

REBOUÇAS, E. de L. *et al.* Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 56, p. 143–154, 2013.

REIS, I. C. dos *et al.* β -glucan mimics tissue damage signaling and generates a trade-off between head kidney and spleen to activate acquired immunity in vaccinated tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 117, p. 179–187, 2021a. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464821002254>. Acesso em: 6 abr. 2023.

REIS, I. C. dos *et al.* β -glucan mimics tissue damage signaling and generates a trade-off between head kidney and spleen to activate acquired immunity in vaccinated tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 117, p. 179–187, 2021b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821002254>. Acesso em: 27 mar. 2023.

ROBERTSEN, B. *et al.* Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of fish diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 391–400, 1990.

RODRIGUES, F. S. *et al.* Sistema imune inato de peixes e o uso do alho como imunoestimulante: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e152943014–e152943014, 2020.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, [s. l.], v. 172, n. 1–2, p. 63–92, 1999.

SALAH, A. S.; EL NAHAS, A. F.; MAHMOUD, S. Modulatory effect of different doses of β -1,3/1,6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 70, p. 204–213, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464817305193>. Acesso em: 6 abr. 2023.

SOTO DÁVILA, M.; LATIMER, M. F.; DIXON, B. Enhancing immune function and fish health in aquaculture. *Em: FISH PHYSIOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2020. v. 38, p. 123–161. *E-book*. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1546509820300030>. Acesso em: 4 abr. 2023.

VALLEJOS-VIDAL, E. *et al.* The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 56, p. 34–69, 2016.

VELÁZQUEZ, J. *et al.* Novel IFN γ homologue identified in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) links with immune response in gills under different stimuli. **Fish & shellfish immunology**, [s. l.], v. 71, p. 275–285, 2017.

VIJAYARAM, S. *et al.* Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 130, p. 294–308, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464822005691>. Acesso em: 6 abr. 2023.

WU, W. *et al.* Multiomics analyses reveal that NOD-like signaling pathway plays an important role against *Streptococcus agalactiae* in the spleen of tilapia. *Fish & shellfish immunology*, [s. l.], v. 95, p. 336–348, 2019

4 - CAPÍTULO 4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO β -GLUCANO SOBRE A IMUNIDADE E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE TILÁPIAS (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) EM SITUAÇÃO DE ESTRESSE

RESUMO

A intensificação das pisciculturas para melhora dos índices produtivos apresenta efeitos adversos como surgimento maior de doenças e necessidade de utilização de antimicrobianos para o combate das infecções. Como alternativa ao uso de drogas muitos estudos são direcionados para produção de vacinas e suplementos que modulem a imunidade dos peixes. O β -glucano pode ativar de forma eficaz, diversos mecanismos de defesa nos peixes e, portanto, nesse capítulo temos o objetivo de avaliar os efeitos desse imunostimulante em situação de estresse sobre as respostas imunes inatas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) pela avaliação de variáveis imunológicas, hematológicas e desempenho zootécnico. 408 tilápias foram divididas randomicamente em oito grupos com 3 repetições cada em arranjo fatorial 2x2x2, como os fatores dieta (controle sem β -glucano e outra com 0,1% de β -glucano). Para simular as situações de estresse os peixes sofreram adensamento, perseguição e exposição aérea, seguida de injeção intraperitoneal de *Streptococcus agalactiae*. Aos 15 e 30 dias foram capturados aleatoriamente 4 peixes de cada caixa (n=12), anestesiados, aferidos os pesos e comprimentos corporais para avaliação dos variáveis de desempenho produtivo (peso final; ganho de peso; taxa de crescimento específico; conversão alimentar; taxa de eficiência protéica e fator de condição corporal), coletado sangue para avaliação de variáveis imunológicas (atividade da lisozima e atividade hemolítica do complemento) e variáveis hematológicas (hemograma, leucograma e índices hematimétricos). Os dados analisados mostraram que o β -glucano foi capaz de modular a resposta imune dos peixes, mas o curto período do experimento não foi capaz de mostrar diferenças significativas no desempenho zootécnico.

Palavras-chave: Sistema Imune. Estresse. *Streptococcus*. Expressão Gênica. Tilápia-Do-Nilo.

ABSTRACT

The fish farming intensification to improve production rates has adverse effects such as a greater appearance of diseases and the need to use antimicrobials to fight infections. As an alternative to the use of drugs, many studies are directed towards the production of vaccines and supplements that modulate the immunity of fish. β -glucan can effectively activate several defense mechanisms in fish and therefore in this chapter we aim to evaluate the effects of this immunostimulant in a situation of stress on the innate immune responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by evaluating immunological variables, haematological and zootechnical performance. 408 tilapias were randomly divided into eight groups with three repetitions each in a 2x2x2 factorial arrangement, as the diet factors (control without β -glucan and another with 0.1% of β -glucan). To simulate stress situations, the fish were crowded, chased and exposed to air, followed by an intraperitoneal injection of *Streptococcus agalactiae*. At 15 and 30 days, 4 fish were captured randomly from each box (n=12), anesthetized, body weights and lengths measured to evaluate productive performance variables (final weight; weight gain; specific growth rate; feed conversion; protein efficiency rate and body condition factor), blood collected for evaluation of immunological variables (lysozyme activity and complement hemolytic activity) and hematological variables (hemogram, leukogram and hematimetric indices). The analyzed data showed that the β -glucan was able to modulate the immune response of the fish, but the brief period of the experiment was not able to show significant differences in the zootechnical performance.

Keywords: Immune System. Stress. *Streptococcus*. Gene Expression. Nile Tilapia.

4.1 Introdução

A produção de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem crescido em vários países, inclusive no Brasil, por ser uma boa alternativa em termos de produção e consumo de proteína animal. Essa espécie apresenta ótimas características zootécnicas como rápido crescimento e adaptação ao nosso clima. Além de boa demanda no mercado nacional o Brasil exporta grande parte da produção para vários países como EUA e Taiwan (FAO, 2022).

Nas últimas décadas a intensificação da piscicultura promoveu alguns fatores de estresse com consequente maior aparecimento de doenças nos animais. Por isso tem-se utilizado grandes quantidades de produtos químicos como desinfetantes e antimicrobianos para prevenção de doenças nos animais (CAO *et al.*, 2019). Além dos prejuízos ao meio ambiente e riscos de indução de patógenos resistentes que esses agentes químicos acarretam, existe grande demanda pela produção de alimentos orgânicos, e com essa premissa os aditivos nutricionais têm sido estudados e utilizados com sucesso na produção de muitas espécies animais (CHAUHAN; SINGH, 2019).

Alguns dos principais agentes causadores de doenças na piscicultura são bactérias como *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. e *Enterococcus* sp., que provocam diminuição da produção causando grandes perdas econômicas. Frente à entrada de patógenos, o primeiro ataque ocorre com o auxílio de componentes humorais como as proteínas da fase aguda da inflamação como o sistema complemento, citocinas e lisozimas (SOTO DÁVILA; LATIMER; DIXON, 2020b). Entre as células de defesa, os fagócitos, representados pelos neutrófilos e macrófagos, são muito importantes por possuírem grandes quantidades de enzimas em lisossomos. Além disso, na presença de bactérias, produzem espécies reativas de oxigênio que são responsáveis pela destruição destes microrganismos (ELLIS, 1999).

O uso de imunoestimulantes é bem conhecido em aquacultura como método de aumentar a imunidade inespecífica e a resistência às doenças (KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021; VALLEJOS-VIDAL *et al.*, 2016) e, nesse contexto, o β -glucano apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatórias (DAWOOD, Mahmoud A. O. *et al.*, 2020; FALCO *et al.*, 2012) podendo ser uma alternativa ao uso de drogas antimicrobianas. O β -glucano estimula a atividade da lisozima em pele, muco, intestino, músculos além de baço, rim cranial e fígado. Em

tilápias foi demonstrado o aumento da lisozima na mucosa da pele de peixes suplementados com esse imunoestimulante (TAOKA *et al.*, 2006). A lisozima é uma importante enzima do componente humoral do sistema imune inato participando da primeira linha de defesa do organismo e está presente em muco, sangue, ovos e em vários tecidos. Presente em grânulos específicos no citoplasma de linfócitos (principalmente monócitos e neutrófilos) atua nos peptídeo-glicano das paredes de bactérias gram positiva e negativa, atacando a ligação glicosídica β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina (NAIEL, M. E. *et al.*, 2022) promovendo a lise celular com destruição dos patógenos atuando em conjunto com o sistema complemento (PAULSEN *et al.*, 2003). Existem 2 tipos conhecidos de lisozima, tipo c (*Chicken*) (LyzC) encontrada em mamíferos, pássaros, répteis anfíbios e peixes (CALLEWAERT; MICHIELS, 2010) e tipo g (*goose*) (LyzG) (LI *et al.*, 2021; MYRNES *et al.*, 2013). Foi relatado que o uso de imunoestimulantes e outros fatores nutricionais podem aumentar a atividade do sistema complemento e da lisozima (SONG *et al.*, 2014; SOTO DÁVILA; LATIMER; DIXON, 2020b). O sistema complemento é um conjunto de proteínas solúveis e de membrana que atuam no sistema imune inato, é importante para o recrutamento de macrófagos, e se unem a parede bacteriana facilitando a fagocitose (HOLLAND; LAMBRIS, 2002).

4.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Verificar se o β -glucano tem efeito sobre as variáveis imunes, fisiológicas e no desempenho zootécnico.
- Avaliar se os protocolos de 15 ou 30 dias, baseado na composição dos imunoestimulantes, pode promover melhor resposta imune.

4.3 Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no biotério do Laboratório de Imunologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Câmpus de Dracena, São Paulo. Foram utilizadas 24 caixas de polietileno tampadas com telas. O sistema de água foi

aberto com renovação constante e a temperatura mantida a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. O local não tinha iluminação natural então havia lâmpadas frias para controle do fotoperíodo (12h luz/ 12h escuro).

4.3.1 Animais e dietas

Foram utilizadas 408 tilápias juvenis, revertidas, provenientes de piscicultura da região de Santa Fé do Sul - SP, com o peso inicial médio de 80g. Os peixes foram distribuídos em 24 caixas, (17 peixes/ caixa) e alimentados durante o período de aclimação (3 semanas) com dieta comercial. Após a aclimação o experimento foi iniciado.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais, no dia 12/07/2018, registrada com o nº: 16/2018R1- CEUA.

No presente experimento, foram elaboradas duas dietas: Dieta controle (livre de β -glucano) e dieta experimental (dieta controle acrescida de 0,1% de β -glucano, ambas preparadas no Instituto de Pesca de São José do Rio Preto SP formuladas de acordo com as exigências da espécie (KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021; PILARSKI *et al.*, 2017) (Tabela 1).

4.3.2 Delineamento experimental

As 408 tilápias foram distribuídas em 24 caixas de polietileno de 100 L com 17 peixes cada, divididas em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2$, com 3 repetições cada.

Tratamento 1 (C15). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 dias de experimento;

Tratamento 2 (C15D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas aos 14 dias, e foram amostradas após 15 dias de experimento;

Tratamento 3 (β 15). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg^{-1} de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas após 15 dias de experimento;

Tratamento 4 (β 15D). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg^{-1} de β -

glucano) por 15 dias, foram desafiadas aos 14 dias, e foram amostradas após 15 dias de experimento;

Tratamento 5 (C30). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas após 30 dias de experimento;

Tratamento 6 (C30D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram desafiadas aos 29 dias, e foram amostradas após 30 dias de experimento;

Tratamento 7 (β 30). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas após 30 dias de experimento;

Tratamento 8 (β 30D). Tilápias receberam dietas experimentais (1g kg⁻¹ de β -glucano) por 30 dias e foram desafiadas aos 29 dias, e foram amostradas após 30 dias de experimento.

Os tratamentos “C15D e β 15D” e “C30D e β 30D” foram desafiados com manejos estressantes (estresse e infecção com $1,0 \times 10^8$ UFC de *S. agalactiae*/peixe inativada) aos 14 e 29 dias, respectivamente, e amostrados após 24 horas. Para as amostragens foram capturados aleatoriamente 4 peixes de cada caixa (n=12/tratamento), sedados em solução de óleo de cravo (1 g 10 L⁻¹ de água), submetidos à coleta de sangue pela veia caudal, para avaliação de análises hematológicas e imunológicas. Depois foram eutanasiados por deslocamento cervical e procedido a coleta de órgãos (rim cranial e baço) utilizados na avaliação da expressão de genes do sistema imune.

4.3.3 Desafio de estresse e infecção experimental

Para a fase final do experimento, foi desenvolvido um protocolo de desafio microbiológico com *S. agalactiae*. As bactérias foram adquiridas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (LAPOA-CAUNESP), cujas cepas foram isoladas e identificadas em peixes a partir de sinais clínicos do animal doente. Para a realização do desafio, utilizou-se as bactérias que cresceram em meio de cultivo BHI, em densidade óptica alta, em torno de 2 (Leitura em 625 nm) que passaram por inativação feita por aquecimento em

garrafa em banho maria à 50°C por 30 min.

O desafio de estresse consistiu em simular alguns manejos ou episódios que são comuns no cultivo de tilápias. Para tal, os peixes dos tratamentos “C15D e β 15D” e “C30D e β 30D” aos 14 e 29 dias de experimento, respectivamente, passaram por 12 horas de adensamento, produzido pela diminuição de metade do volume de água da caixa. Os peixes sofreram perseguição por 10 minutos e exposição aérea por 3 minutos, repetidos no período da manhã e da tarde. Em seguida, foram inoculados, por injeção intraperitoneal de 100 μ L por 10g de peso vivo de suspensão de *S. agalactiae* inativada na concentração de $1,3 \times 10^8$ UFC/ mL⁻¹ na cavidade pélvica dos peixes.

4.3.4 Análises laboratoriais

Para este capítulo foram analisados a atividade da lisozima no soro, a atividade hemolítica do sistema complemento, as variáveis hematológicas e o desempenho zootécnico dos peixes, conforme descrito a seguir.

4.3.4.1 Atividade da lisozima no soro

A determinação da concentração e atividade de lisozima foi baseada no método clássico de lisar uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e foi medida por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (BECKER; HARTSELL, 1954). A análise foi realizada por ensaio turbidimétrico, segundo Chandan; Parry; Shahani (1965) com adaptações.

A partir da curva padrão, determinada utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha, foi quantificada e as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta. Após a determinação de curva de calibração, os soros de peixes de todos os tratamentos, inicialmente, passaram por tratamento térmico (banho a 56°C por 30 min) para inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo, assim, que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* fosse provocada exclusivamente por ação da lisozima. Assim, 50 μ L soro de tilápias (em triplicata) foram depositados em microplacas, de acrílico estéril de 96 cavidades, em 50 μ L de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2), após homogeneização, o soro foi submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2, mantendo um volume final de 50 μ L por cavidade. Em cada cavidade foram depositados 125 μ L de suspensão de

M. lysodeikticus (0,2% em tampão fosfato de sódio). A redução da densidade óptica, em 450 nm, foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 30°C. Os resultados em concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$ de amostra) foram obtidos a partir da redução da δ DO para cada volume de amostra avaliada, e os resultados em unidade de atividade (U mL^{-1}) foi determinada como a quantidade de enzima que produziu, em 450 nm, um δ DO de $0,001 \text{ min}^{-1}$ (WON; KIM; PARK, 2004).

4.3.4.2 Atividade hemolítica do complemento – Via alternativa

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada de acordo com metodologia descrita previamente por Biller-Takahashi *et al.* (2013). Uma alíquota de sangue total de - foi misturada a um mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante filtrada em gaze estéril para retirada de material suspenso. A solução filtrada foi adicionada o mesmo volume do agente quelante TEA-EDTA (trietanolamina - ácido etileno diaminotetracético) 10 mM, pH 7,4 e gelatina a 0,1%, e esta solução incubada por 15 min, a 37°C, e centrifugada a 2500 rpm, por 10 min, a 4°C, para separação dos eritrócitos. Os eritrócitos, então, ressuspensos em tampão TEA – Mg^{2+} 2 mM, pH 7,4 e lavados com o mesmo tampão por 3 vezes após centrifugação (2500 rpm, por 10 min, a 4°C). Os eritrócitos, depois da última centrifugação, foram ressuspensos em solução de Alséver e armazenados a -10°C, sendo viável por até 15 dias. No momento da utilização, parte da suspensão de eritrócitos armazenada foi lavada duas vezes com tampão TEA-EGTA (trietanolamina - ácido etileno glicol tetracético) 8 mM e Mg^{2+} 2mM, com gelatina 0,1% (2500 rpm, por 10 min, a 4° C) e ressuspensos em tampão TEA-EGTA 1%, em densidade óptica entre 0,8 e 0,9, a 700 nm. A análise da atividade hemolítica do complemento foi realizada pela mistura de 200 μL de cada diluição de soro com 400 μL da suspensão de eritrócitos, a qual foi submetida à leitura da absorbância em comprimento de onda de 700 nm, por 10 min, em espectrofotômetro cinético provido de banho a 37° C. Após a padronização da diluição do soro a ser utilizada, 60 μL de soro de peixes de todos os tratamentos, na diluição de 1:10, foram adicionados a 140 μL de tampão TEA-EGTA 8 mM e Mg^{2+} 2mM, com gelatina 0,1%, e a essa mistura acrescentados 400 μL da suspensão de eritrócitos. A solução foi, então, submetida a leitura em espectrofotômetro tipo ELISA como descrito.

4.3.4.3 Atividade respiratória de leucócitos

A análise da atividade respiratória de leucócitos foi realizada de acordo com metodologia descrita previamente por Biller-Takahashi *et al.* (2013). Resumidamente, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação, 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm

4.3.4.4 Análises hematológicas

No sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito (centrífuga de micro hematócrito), número de eritrócitos (NE), volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM), concentração de hemoglobina e número de células total (eritrócitos, leucócitos e trombócitos) e diferencial (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilo e basófilo) em extensões sanguíneas. A contagem total dos eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, e dos leucócitos foi realizada por método indireto, pela quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas obtido no contador de células. Já o diferencial de leucócitos foi quantificado contando-se 200 células e estimando-se para o total de leucócitos

4.3.4.5 Avaliações do desempenho zootécnico

Nesse experimento foram avaliadas as seguintes variáveis zootécnicas:

Ganho de peso: $GP (g) = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}$;

Taxa de crescimento específico: $TCE (\%) = 100 \times [(\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}) \div \text{período experimental}]$;

Consumo alimentar diário: $CAD (\%) = 100 \times [\text{alimento consumido total (g)} \div (\text{peso inicial (g)} \times \text{período experimental})]$;

Conversão alimentar: $CA = \text{consumo médio (g)} \div \text{ganho de peso médio (g)}$;

Taxa de eficiência protéica: $TEP (\%) = 100 \times (\text{ganho de peso (g)} \div \text{proteína bruta consumida (g)})$;

Fator de condição corporal: $K = 100 \times [\text{peso} / (\text{comprimento total})^3]$.

4.3.5 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância adotado de 5%, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.4 M7.

4.4 Resultados e Discussão

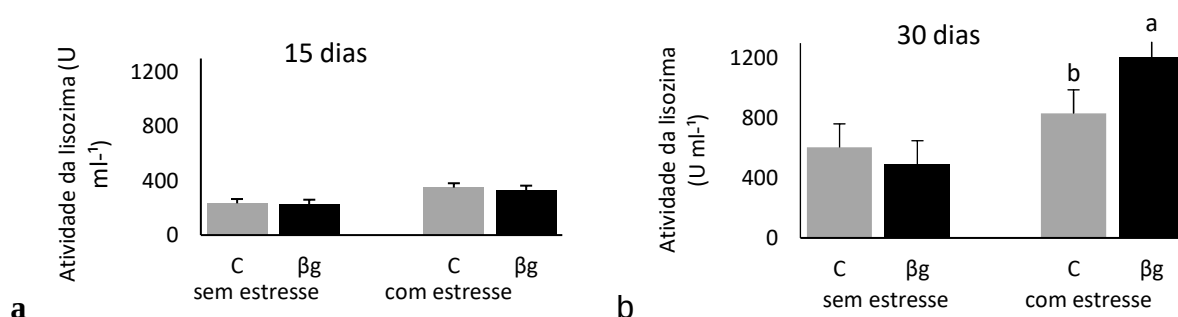
Neste item serão apresentados os resultados e as discussões relativos aos dados obtidos no experimento, com as metodologias descritas acima.

4.4.1 Atividade da lisozima

A atividade da lisozima apresentou interação entre os dias, as rações e o estresse; e a adição de β -glucano, por 30 dias na dieta dos peixes desafiados mostrou aumentos significativos da atividade dessa proteína, em relação aos que receberam dieta controle (Figura 21). Resultados semelhantes foram observado realizado por Dou *et al.* (DOU *et al.*, 2023) com tilápias desafiadas com *Aeromonas hydrophila*, no qual a atividade plasmática da lisozima foi acentuadamente aumentada pela inclusão de 0,4–0,8% de β -glucano. O mesmo resultado foi observado em tilápias após 30 dias de tratamento com β -glucano, com aumento da atividade da lisozima, entretanto quando desafiadas com Clorpirifós, a atividade apresentou decréscimos nos peixes alimentados com β -glucano comparado ao grupo controle (DAWOOD, Mahmoud A. O. *et al.*, 2020). Trabalho com tilápias realizado por El-Boshy *et al.* (EL-BOSHY *et al.*, 2010), comparou os tratamentos com *Saccharomyces*, laminaran e β -glucano por 21 dias desafiados com cloridrato de mercúrio em doses subletais, observaram que o β -glucano apresentou os melhores resultados de lisozima sérica em relação aos demais, mostrando a estimulação imune desse suplemento. Outro produto estudado, *L. plantarum*, mostrou resultados semelhantes com aumento da atividade da lisozima tanto com quinze como trinta dias de suplementação (VAN DOAN *et al.*, 2018). Experimento com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) suplementadas com três

concentrações diferentes de β -glucano (0,1%,0,2% e 0,5%) observou diferenças da lisozima sérica entres os dois períodos (15 e 30 dias), sendo maior com 30 dias de administração; e ainda, as diferentes concentrações não mostraram diferenças significativas, nem o desafio com *Aeromonas hydrophila* (DOUXFILS *et al.*, 2017) O uso do selênio por 10 dias, em diferentes concentrações, em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) mostrou diferenças séricas significativas da atividade da lisozima, principalmente na concentração de 0.6 mg Se levedura kg^{-1} (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2015). Goma arábica adicionada à ração mostrou aumentos significativos da lisozima sérica, em tilápias do Nilo (NAIEL, M. A. E. *et al.*, 2022).

Figura 17 - Atividade da lisozima em tilápias alimentadas com β -glucano



Legenda: a 15 dias, b 30 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$.

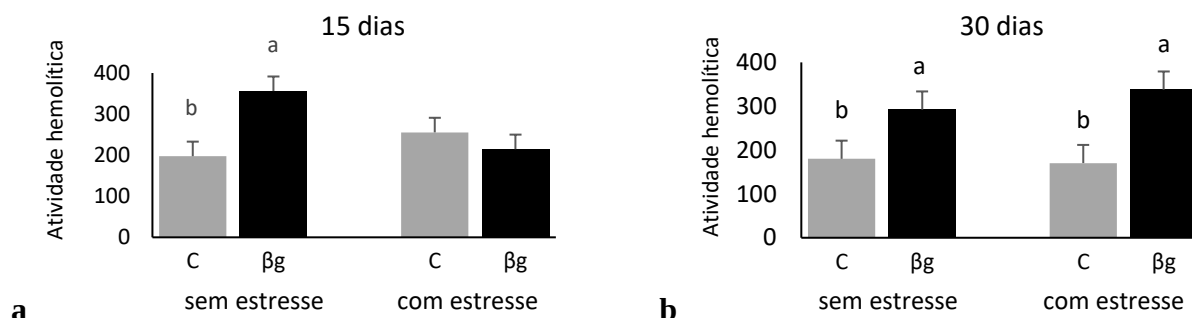
C= dieta controle, βg= dieta β -glucano, Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.2 Atividade hemolítica do complemento

Nesse experimento, os grupos que receberam o β -glucano por 15 e 30 dias mostraram aumentos significativos da atividade hemolítica do complemento, mas quando os peixes foram desafiados o aumento ocorreu apenas no segundo período (Figura 22). Resultados semelhantes com a concentração plasmática do componente c3 foram vistos com uso de três concentrações de β -glucano (DOU *et al.*, 2023). Outro estudo com tilápias tratadas com o probiótico *Enterococcus faecium* ZJ4 também apresentaram maiores valores da concentração sérica do complemento quando comparado à dieta sem o aditivo (WANG *et al.*, 2008b). Aumentos do complemento sérico também foi observado em tilápias alimentadas por 8 semanas com goma arábica (NAIEL, M. A. E. *et al.*, 2022).

Figura 18 - Atividade hemolítica do complemento em tilápias alimentadas com β -glucano



Legenda: a 15 dias, b 30 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$.

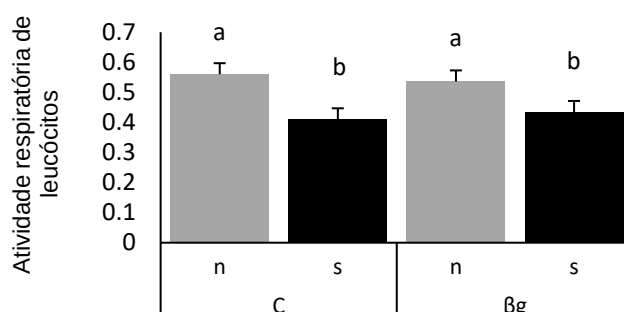
C= dieta controle, β g= dieta β -glucano, Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.3 Atividade respiratória de leucócitos

Neste estudo a atividade respiratória de leucócitos apresentou-se diminuída em presença de estresse com as duas dietas oferecidas aos peixes (Figura 23). Em trabalhos com uso de β -glucano também em tilápias, não observaram diferenças significativas desse parâmetro (CAO *et al.*, 2022; DOU *et al.*, 2023). Contrariamente aos nossos resultados, tilápias alimentadas com β -glucano e expostas ao Diazinon apresentaram maiores valores de atividade respiratória de leucócitos quando comparado com grupo controle (ABDELHAMID; ELSHOPAKEY; AZIZA, 2020) e outro experimento também com β -glucano por 15 e 30 dias apresentaram aumentos desse índice, mas com 7 e 14 dias após a retirada do imunoestimulante, não mostraram diferenças significativas (KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021).

Figura 19 - Atividade respiratória de leucócitos em tilápias alimentadas com β -glucano



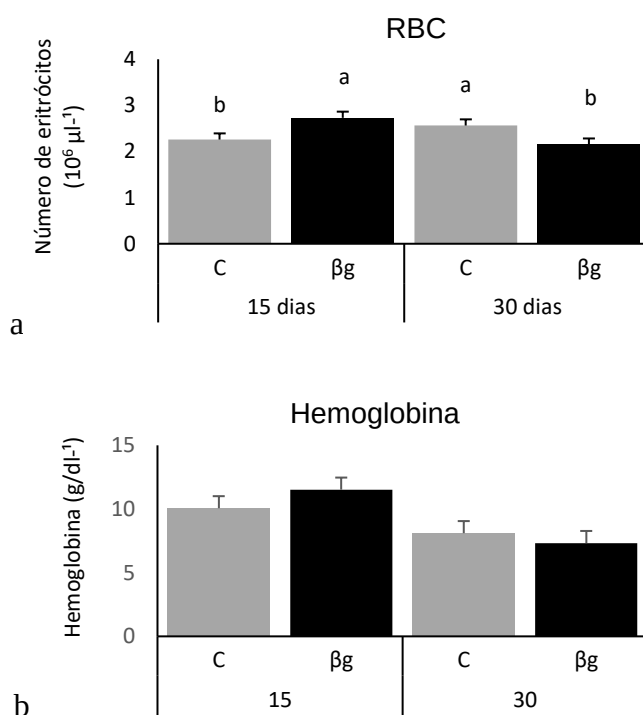
Legenda: Atividade respiratória de leucócitos de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P < 0.05$.

C= dieta controle, β g= dieta β -glucano, n= sem estresse e s= com estresse. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.4 Parâmetros hematológicos

Em 15 dias de suplementação com β -glucano observamos aumento do número de eritrócitos, mas em 30 dias esses valores diminuíram (Figura 24a). Os parâmetros da hemoglobina foram semelhantes ao número de eritrócitos, porém sem diferenças significativas (Figura 24b).

Figura 20 - Parâmetros hematológicos em tilápias alimentadas com β -glucano



Legenda: a RBC (red blood cel), b hemoglobina. Letras diferentes indicam diferenças significativas. C= dieta controle, βg = dieta β -glucano, n= sem estresse e s= com estresse. Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. $P < 0.05$. Elaborado pela autora.

Nos demais parâmetros sanguíneos não foram observados diferenças significativas nas tilápias suplementadas com beta glucano e submetidas a desafios de manejo (tabela 8). Experimento também como tilápias, porém utilizando goma arábica como imunoestimulante, mostrou aumentos nos valores de hemoglobina e de células brancas (NAIEL, M. E. *et al.*, 2022). Outras concentrações de β -glucano (0,4 e 0,8%) oferecidas às tilápias por 10 semanas mostraram semelhante diminuição no nível de hemoglobinas, porém marcado aumento na contagem de leucócitos (DOU *et al.*, 2023).

Tabela 6 - Parâmetros hematológicos de tilápias alimentadas com β -glucano e desafiadas com manejos estressantes.

Variáveis	15 dias				30 dias			
	C	Ce	β g	β ge	C	Ce	β g	β ge
HT (%)	29,25	17,38	31,80	27,13	30,96	28,21	31,90	28,13
Leucócitos ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	177,12	72,36	222,69	95,93	192,62	119,18	165,65	84,24
Linfócito ($\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$)	160,79	63,26	209,96	68,41	183,62	90,37	160,13	71,76
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$)	11,98	2,17	9,17	5,09	7,08	11,24	3,75	4,60
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$)	3,62	11,01	2,16	8,16	1,85	12,51	1,73	7,80
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$)	0,72	0,82	1,40	1,30	0,08	0,28	0,05	0,07

Legenda: C= dieta controle, β g= dieta com β -glucano, e= desafiado. Fonte: Elaborado pela autora

4.4.5 Desempenho zootécnico

Em relação ao desempenho zootécnico não observamos diferenças significativas entre os valores estudados (Tabela 9). Resultados semelhantes foram observados com as mesmas espécies de peixe, alimentados por 8 semanas (AKHTAR, M.S. *et al.*, 2021b) e por 10 semanas com β -glucano (DOU *et al.*, 2023) e foi observado, ainda com tilápias suplementadas com β -glucano, mas desafiadas apenas com situação de hipóxia, que também não apresentaram diferenças no desempenho zootécnico (DE SOUZA *et al.*, 2020). Cao *et al.* (CAO *et al.*, 2022) em experimento com tilápias e Lopes; De Mello; Urbinati, (LOPES; DE MELLO; URBINATI, 2022) com peixes pacu também não observaram diferenças significativas desse índice com a inclusão desse imunoestimulante.

Resultados um pouco diferentes dos nossos foram vistos em carpas, onde (CAO *et al.*, 2019) mostrou diminuição do IHC (índice hepato-corporal) com o uso do β -glucano em relação à dieta controle. O uso do β -glucano a 0,1% por 15 e 30 dias

mostrou relativo ganho de peso de 8% comparado com o grupo controle, mas os outros parâmetros não apresentaram diferenças significativas (KOCH; DE OLIVEIRA; ZANUZZO, 2021). Experimento com valores diferentes de adensamento mostrou que o β -glucano foi efetivo em alta densidade de peixes, em relação ao ganho de peso, conversão alimentar e crescimento específico, mas em média e baixa densidades não mostrou diferenças (DAWOOD, Mahmoud A. O. *et al.*, 2020). A adição de goma arábica como imunoestimulante, por 8 semanas apresentou maior ganho de peso e diminuição da conversão alimentar, comparado à ração controle (NAIEL, M. A. E. *et al.*, 2022).

Tabela 7 - Desempenho zootécnico de tilápias alimentadas com β -glucano e submetidas ao estresse de manejo

Variáveis	15 dias				30 dias			
	C	Ce	β	β e	C	Ce	β	β e
GP (g)	26,61	31,33	29,57	29,20	48,38	50,05	54,37	56,80
TCE (%)	177,38	208,83	197,16	194,66	161,25	166,84	181,23	189,32
CAD (%)	47,00	50,62	48,65	53,26	51,73	50,61	50,43	52,27
CA	1,748	1,953	2,095	2,317	3,075	2,892	3,412	3,362
TEP (%)	1,31	1,12	1,16	1,17	0,72	0,68	0,63	0,61
K	1,80	2,06	1,81	1,90	1,83	1,95	1,81	2,04
IHS (%)	2,89	2,95	2,49	2,70	3,13	2,96	2,47	2,11

Legenda: C= dieta controle, β g= dieta com β -glucano, e= desafiado. Fonte: Elaborado pela autora

4.5 Conclusão

O presente experimento foi realizado com animais juvenis, portanto nem todos os sistemas orgânicos estão plenamente desenvolvidos, e o período de apenas 30 dias talvez tenha sido o motivo por não observarmos diferenças no desempenho zootécnico. Mas a adição de β -glucano na dieta das tilápias foi capaz de estimular a

ação de enzimas líticas como a lisozima e o sistema complemento e atenuar a atividade respiratória de leucócitos. Dessa maneira, deve-se considerar que a suplementação do β -glucano resulta em efeitos protetores, evitando o desenvolvimento de muitas doenças e no decorrer da produção pode melhorar o desempenho zootécnico.

4.6 Referências

- ABDELHAMID, F. M.; ELSHOPAKEY, G. E.; AZIZA, A. E. Ameliorative effects of dietary *Chlorella vulgaris* and β -glucan against diazinon-induced toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 96, p. 213–222, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464819311374>. Acesso em: 23 mar. 2023.
- BECKER, M. E.; HARTSELL, S. E. Factors affecting bacteriolysis using lysozyme in dual enzyme systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 402–410, 1954. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000398615490421X>. Acesso em: 4 abr. 2023.
- BILLER-TAKAHASHI, J. et al. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 425–429, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842013000200425&lng=en&tlng=en. Acesso em: 4 abr. 2023.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D. et al. The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 360–367, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464815301479>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- CALLEWAERT, L.; MICHIELS, C. W. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 127–160, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-010-0015-5>. Acesso em: 24 mar. 2023.
- CAO, H. et al. Effects of dietary supplementation with β -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). *Aquaculture*, [s. l.], v. 508, p. 106–112, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004484861930136X>. Acesso em: 3 abr. 2023.
- CAO, Y. et al. Effects of dietary supplemented with a combination of magnolol, palmitate and β -glucan on growth rate, antioxidant activity, immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports*, [s. l.], v. 27, p. 101337, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513422003337>. Acesso em: 20 mar. 2023.
- CHANDAN, R. C.; PARRY, R. M.; SHAHANI, K. M. Purification and some properties of bovine milk lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 389–398, 1965. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926659365800467>. Acesso em: 4 abr. 2023.

CHAUHAN, A.; SINGH, R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis*, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 99–113, 2019.

DAWOOD, M. A. O. et al. The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. *Aquaculture*, [s. l.], v. 523, p. 735205, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484862030020X>. Acesso em: 21 mar. 2023.

DE SOUZA, F. P. et al. Effect of β -glucan in water on growth performance, blood status and intestinal microbiota in tilapia under hypoxia. *Aquaculture Reports*, [s. l.], v. 17, p. 100369, 2020.

DOU, X. et al. Effects of dietary β -glucan on growth rate, antioxidant status, immune response, and resistance against *Aeromonas hydrophila* in genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports*, [s. l.], v. 29, p. 101480, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513423000194>. Acesso em: 23 mar. 2023.

DOUXFILS, J. et al. Dietary β -glucans differentially modulate immune and stress-related gene expression in lymphoid organs from healthy and *Aeromonas hydrophila*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 63, p. 285–296, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464817301006>. Acesso em: 4 abr. 2023.

EL-BOSHY, M. E. et al. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 802–808, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464810000306>. Acesso em: 4 abr. 2023.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 291–308, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464898901929>. Acesso em: 20 mar. 2023.

FALCO, A. et al. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1051–1057, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464812000800>. Acesso em: 20 mar. 2023.

HOLLAND, M. C. H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 399–420, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464801904085>. Acesso em: 20 mar. 2023.

KOCH, J. F. A.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 112, p. 56–63, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821000450>. Acesso em: 20 mar. 2023.

LI, K. et al. The involvement of TNF- α and TNF- β as proinflammatory cytokines in lymphocyte-mediated adaptive immunity of Nile tilapia by initiating apoptosis. *Developmental & Comparative Immunology*, [s. l.], v. 115, p. 103884, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X20304390>. Acesso em: 24 mar. 2023.

LOPES, L. M. F.; DE MELLO, M. M. M.; URBINATI, E. C. β -Glucan reduces cortisol plasma levels, enhances innate immune system after *A. hydrophila* inoculation, and has lipolytic effects on the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, [s. l.], v. 546, p. 737411, 2022.

MYRNES, B. et al. Enzyme characterisation and gene expression profiling of Atlantic salmon chicken- and goose-type lysozymes. *Developmental & Comparative Immunology*, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 11–19, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X13000244>. Acesso em: 20 mar. 2023.

NAIEL, M. A. E. et al. Gum Arabic-enriched diet modulates growth, antioxidant defenses, innate immune response, intestinal microbiota and immune related genes expression in tilapia fish. *Aquaculture*, [s. l.], v. 556, p. 738249, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848622003659>. Acesso em: 4 abr. 2023.

NAIEL, M. E. et al. The mitigating role of probiotics against the adverse effects of suboptimal temperature in farmed fish: a review. *Aquaculture*, [s. l.], p. 737877, 2022.

PAULSEN, S. M. et al. In vivo effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 39–54, 2003.

PILARSKI, F. et al. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. *Fish & shellfish immunology*, [s. l.], v. 70, p. 25–29, 2017.

SONG, S. K. et al. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology*, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 40–48, 2014.

SOTO DÁVILA, M.; LATIMER, M. F.; DIXON, B. Enhancing immune function and fish health in aquaculture. Em: *FISH PHYSIOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2020. v. 38, p. 123–161. E-book. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1546509820300030>. Acesso em: 4 abr. 2023.

TAOKA, Y. et al. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, [s. l.], v. 72, p. 755–766, 2006.

VALLEJOS-VIDAL, E. et al. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & Shellfish Immunology*, [s. l.], v. 56, p. 34–69, 2016.

VAN DOAN, H. et al. Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, [s. l.], v. 491, p. 94–100, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004484861830259X>. Acesso em: 4 abr. 2023.

WANG, Y.-B. et al. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, [s. l.], v. 277, n. 3–4, p. 203–207, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848608001488>. Acesso em: 4 abr. 2023.

WON, G.-M.; KIM, S.-M.; PARK, S.-I. The effects of backslash beta -1, 3/1, 6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral admimistration. *Journal of fish pathology*, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 29–38, 2004.