

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

DURAÇÃO DO EFEITO IMUNOESTIMULANTE DA GLUCANA

PÓS ADMINISTRAÇÃO EM PACU.

Thaís Daltoso da Silva

Jaboticabal, São Paulo
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

DURAÇÃO DO EFEITO IMUNOESTIMULANTE DA GLUCANA

PÓS ADMINISTRAÇÃO EM PACU.

Thaís Daltoso da Silva

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Co-orientadora: Jaqueline Dalbello Biller

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

Jaboticabal, São Paulo

2021

S586d Silva, Thaís Daltoso da
Duração do efeito imunoestimulante da glucana pós administração em pacu / Thaís Daltoso da Silva. -- Jaboticabal, 2021.
vi, 49 p. : il. ; 29 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2021
Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati
Banca examinadora: Edsandra Campos Chagas, Rafael Estevan Sabioni
Bibliografia

1. Imunoestimulante. 2. Glucana. 3. Lipopolissacarídeo. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.05

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aqüicultura da Unesp - CAUNESP



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: DURAÇÃO DO EFEITO IMUNOESTIMULANTE DA GLUCANA PÓS ADMINISTRAÇÃO EM PACU

AUTORA: THAÍS DALTOSO DA SILVA

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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

Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI (Participação Virtual)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP – Jaboticabal

Dra. EDSANDRA CAMPOS CHAGAS (Participação Virtual)

. / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Ocidental

Dr. RAFAEL ESTEVAN SABIONI (Participação Virtual)

. / ESALQ/USP, Piracicaba-SP

Jaboticabal, 26 de julho de 2021

Centro de Aqüicultura da Unesp
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal SP Brasil
Tel 55 16 32032110 ramal 214 fax 55 16 32032268
pgaqul@caunesp.unesp.br www.caunesp.unesp.br

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus por todas as oportunidades que tive em minha vida e por cuidar tão bem do meu destino.

Agradeço a Prof. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela orientação durante o período do mestrado, por ter me aceitado para fazer parte da equipe, foi um prazer ser orientada por uma grande pesquisadora.

Agradeço a minha co-orientadora Prof. Dra. Jaqueline Dalbello Biller, por ter me mostrado o caminho da pesquisa e por todas as oportunidades que me ofereceu.

Ao LAFIPE e a Damares, pela ajuda no experimento, e por todos os momentos que trocamos conhecimento, foi um prazer aprender com o pessoal do laboratório.

Agradeço a todo o pessoal do CAUNESP, em especial a minha grande companheira dentro e fora do mestrado, Karen, ter alguém para compartilhar as experiências e momentos nesse período do mestrado foi de suma importância, ganhei uma grande amiga.

À minha família, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, me ajudando, acreditando que eu estava trilhando o caminho certo. Por serem afeto, ter minha família é o bem mais precioso que tenho a oportunidade de vivenciar em vida.

Ao meu namorado, Matheus, por ser companheiro em todos os momentos.

À todas as minhas amigas, graças a Deus sou rodeada de pessoas do bem, pessoas em que posso confiar e contar em todos os momentos, ter minhas amigas nesse período assim como em todos os outros, foi muito importante.

À todos os funcionários do Caunesp, principalmente ao Valdecir por toda ajuda com os peixes e em outras etapas do experimento e ao Prof. Dr. João Batista por ter cedido o sistema de recirculação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo para a realização desse trabalho.

À Biorigin pelo fornecimento da β -glucana.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e concretização desse trabalho.

APOIO FINANCEIRO

CNPq, Bolsa de Mestrado, Processo nº 130871/2019-2

SUMÁRIO

1. PANORAMA DA AQUICULTURA.....	12
2. A INTENSIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO.....	12
3. SISTEMA IMUNE	14
3.1. Sistema Imune Inato.....	14
3.2. Sistema imune adaptativo	17
4. IMUNOESTIMULANTES	18
5. β -GLUCANA	20
6. LPS (Lipopolissacarídeo).....	23
7. PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Animais e protocolo experimental.....	35
2.2. Desenho experimental.....	36
2.3. Processamento da ração.....	36
2.4. Coletas e análises laboratoriais.....	37
2.4.1 Indicadores de estresse	37
2.4.2 Indicadores de imunidade inata.....	37
2.5. Análise estatística.....	38
3. RESULTADOS	39
3.1. PESO CORPORAL	40
3.2. INDICADORES DE ESTRESSE	40
3.2.1. Concentração plasmática de cortisol.....	40
3.2.2. Concentração plasmática da glicose	41
3.3. INDICADORES DE IMUNIDADE INATA	42
3.3.1. Atividade respiratória dos leucócitos (ARL).....	42
3.3.2. Atividade hemolítica do Sistema Complemento (HA-AP)	43
3.3.3. Concentração sérica da lisozima.....	44
4. DISCUSSÃO.....	45
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho experimental do projeto.....34
- Figura 2.** Peso aos dias 1, 15 e 30 do experimento em pacus alimentados com ração controle e suplementada com 0,1 % β -glucana. Letras minúsculas indicam diferença entre os dias de coleta, independente do tratamento. Teste de Tukey ($p < 0,05$).....38
- Figura 3.** Concentração plasmática de cortisol de pacus alimentados com ração controle ou com 0,1% de β -glucana, aos 15 e 30 dias, nas diferentes amostragens, após inoculação do LPS: 3, 6 e 24h. Ausência de letras indica que não houve diferenças pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).....39
- Figura 4.** Concentração plasmática da glicose em pacus alimentados com ração controle ou com 0,1% de β -glucana, e inoculados com LPS aos 15 e 30 dias de experimento. Letras maiúsculas indicam diferença entre os períodos experimentais (15 e 30 dias) para o mesmo tempo de coleta e letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de coleta (0, 3, 6 e 24h) para o mesmo período experimental. Ausência de letras indica que não houve diferenças pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).....40
- Figura 5.** Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) de pacus alimentados com ração controle ou com adição de 0,1% de β -glucana, e inoculados com LPS aos 15 e 30 dias de experimento e amostrados 3, 6 e 24h depois. Letras minúsculas indicam diferença entre os dias 15 e 30 dias, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....41
- Figura 6.** Atividade hemolítica do sistema complemento (HA-AP) de pacus alimentados com ração controle ou com adição de 0,1% de β -glucana e inoculados com LPS aos 15 e 30 dias de experimento e amostrados 3, 6 e 24h depois ($p < 0,05$).....42
- Figura 7.** Concentração sérica da lisozima de pacus alimentados com ração controle ou com adição de 0,1% de β -glucana e inoculados com LPS aos 15 e 30 dias de experimento e amostrados 3, 6 e 24h depois ($p < 0,05$).....43

RESUMO

O cenário atual da aquicultura mundial é muito promissor, e o Brasil tem grande vantagem nessa atividade de produção, pois conta com grandes áreas de água salgada e água doce, além do aumento de tecnologias destinada a alcançar a melhor produtividade. Entre as espécies produzidas, está o pacu, com representatividade e potencial entre os peixes nativos, pelo seu valor comercial na aquicultura e na pesca esportiva. Porém, o aumento da produção se dá às custas de manejos intensos que causam estresse nos animais, e podem desenvolver distúrbios fisiológicos, que geram susceptibilidade a doenças e consequente perda para os produtores. Como alternativa de prevenção, está o uso de β -glucana, um imunostimulante presente na parede celular de bactérias, fungos, plantas e algas, que pode melhorar as respostas imunes inatas dos peixes. Neste contexto, o presente estudo avaliou o tempo de atuação de β -glucana em pacus, depois de 15 dias de alimentação com ração suplementada com 0,1% do imunostimulante, e 15 dias após a suspensão da alimentação suplementada, após inoculação dos peixes com lipopolissacarídeo (LPS), por meio de indicadores da resposta de estresse (concentração de cortisol e glicose plasmática) e do sistema imune inato (atividade respiratória de leucócitos, a atividade hemolítica do sistema complemento e concentração de lisozima). A β -glucana não afetou o peso dos peixes, após o período de oferta, e também não alterou os indicadores de estresse e da imunidade inata no desafio realizado com LPS na concentração utilizada ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de LPS de *E. Coli*).

Palavras chave: Sistema imune, imunidade treinada, lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

The current scenario of world aquaculture is very promising, and Brazil has a great advantage in this production activity, as it has large areas of salt water and fresh water, in addition to the increase in technologies aimed at achieving better productivity. Among the species produced is the pacu, with representation and potential among native fish, due to its commercial value in aquaculture and sport fishing. However, the increase in production comes at the expense of intense handling that causes stress to the animals, and can develop physiological disorders, which generate susceptibility to diseases and consequent loss for producers. As an alternative for prevention, there is the use of β -glucan, an immunostimulant present in the cell wall of bacteria, fungi, plants and algae, which can improve the innate immune responses of fish. In this context, the present study evaluated the time of action of β -glucan in pacus, after 15 days of feeding with feed supplemented with 0.1% of the immunostimulant, and 15 days after suspension of the supplemented feed, after inoculation of fish with lipopolysaccharide (LPS), through indicators of the stress response (concentration of cortisol and plasma glucose) and the innate immune system (respiratory activity of leukocytes, hemolytic activity of the complement system and lysozyme concentration). The β -glucan did not affect the fish weight after the offer period, nor did it alter the stress and innate immunity indicators in the challenge performed with LPS at the concentration used ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$ LPS from *E. Coli*). Although the concentration of LPS used did not affect the animal's innate immune response, it changed the glucose profile, indicating that the procedure acted as a stressor.

Key words: Immune system, trained immunity, lipopolysaccharide.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. PANORAMA DA AQUICULTURA

O cenário da aquicultura mundial é muito promissor. A atividade é conhecida por sua importância econômica e geração de empregos, além de produzir proteína de alto valor biológico para a humanidade. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO, 2020), a aquicultura mundial bateu um novo recorde, com 114,5 milhões de toneladas produzidas em 2018, sendo a China o maior produtor.

Segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR, 2020), o Brasil, em 2019, atingiu produziu 758.006 toneladas de peixes, com receita de cerca de 5,6 bilhões de reais, com crescimento significativo da atividade, de 31% nos últimos seis anos. O país tem características hídricas que favorecem esse crescimento da produção de organismos aquáticos, pois conta com 12% dos recursos mundiais de água doce e um vasto território de água de salgada, com potencial para exploração (Crepaldi et al., 2006).

A produção brasileira de peixes, em sua maior parte, abastece o mercado interno, porém o país vem ganhando espaço no comércio externo, segundo dados da Peixe Br. No primeiro semestre de 2020, as exportações brasileiras aumentaram 33%, se comparado ao mesmo período de 2019. Acredita-se que a tendência seja o aumento do consumo, uma vez que, nas últimas décadas, o comércio de produtos provindo da aquicultura acompanha o desenvolvimento dos padrões de qualidade e segurança alimentar, o que garante proteção ao consumidor que busca uma qualidade de vida melhor. A proteína dos peixes representa uma fonte valiosa para diversificação de uma dieta saudável, por oferecer vitaminas como A, B e D, além de minerais, aminoácidos essenciais e o ômega 3 (FAO, 2020). Com esse crescimento no consumo, a aquicultura moderna vem buscando aperfeiçoar os sistemas de produção para garantir a demanda de peixes e satisfazer as necessidades de proteína de qualidade para a população.

2. A INTENSIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO

Desde a década de 80, a produção de organismos aquáticos vem crescendo,

devido a percepção das características nutricionais que essas fontes de proteína oferecem, além dos estudos que cada vez mais melhoram a tecnologia de produção. No entanto, com o crescimento e a intensificação, surgiram desafios, uma vez que os animais passaram a ser estocados em altas densidades, sujeitos a inúmeros manejos físicos e condições ambientais alteradas que causam estresse. Nessa condição, ocorrem alterações fisiológicas que afetam negativamente a eficiência do sistema imunológico, comprometendo a resistência aos patógenos do ambiente (Tort, 2011).

Com o aumento da produção, houve aumento de doenças que afetam o desempenho dos peixes, diminuindo sua eficiência alimentar e o crescimento, com redução significativa da produção e perdas econômicas para a aquicultura. Segundo Tavares-Dias e Martins (2017), no Brasil, as doenças resultam em uma perda anual de 15% na produção da piscicultura de água doce. Assim, o grande desafio para o setor passou a ser o aumento da produtividade, das taxas de sobrevivência, combatendo as doenças, cujo aparecimento é, muitas vezes, favorecido pela densidade de estocagem, qualidade de água, entre outros fatores. Para tentar combater as doenças, o setor produtivo passou a fazer uso de antibióticos e quimioterápicos, procedimento muito questionado na atualidade, já que podem causar resistência bacteriana, deixar resíduos na carcaça do animal e gerar problemas na comercialização (Romero et al., 2012).

O uso indiscriminado dos antibióticos na aquicultura levou ao desenvolvimento de várias cepas bacterianas resistentes e, como consequência disso, a necessidade de administração alternada dos antimicrobianos (Park et al., 2012). Além disso, 60 a 73% das doses de antibióticos e outros medicamentos químicos utilizados nos peixes podem ser excretados pelas fezes, contaminando o ambiente (Rigos et al., 2004).

Com o aumento gradativo no uso inadequado dos antibióticos e levando em consideração a preocupação com a segurança alimentar, a pesquisa e a produção de agentes biológicos e não tóxicos, para serem utilizados como alternativa aos antibióticos, passou a ser uma meta no setor de produção de organismos aquáticos. Como exemplo, estão os imunoestimulantes, que podem induzir uma forte resposta de defesa no organismo, além de aumentar a capacidade de resistência às doenças na aquicultura (Wang et al., 2017).

3. SISTEMA IMUNE

O sistema imunológico é um importante mecanismo de sobrevivência para todos os animais, pois possui um conjunto de componentes que defende o organismo contra substâncias estranhas e patogênicas. Do ponto de vista evolutivo, estudar o sistema imune de invertebrados se tornou indispensável, pois a partir disso pode-se caracterizar a história evolutiva do sistema imunológico de todos os vertebrados (Zhu et al., 2012).

Diferente dos mamíferos, os peixes não possuem medula óssea e linfonodos, sendo os tecidos e órgãos que constituem o sistema imune destes animais, chamados de linfoides, e são: rins, timo, baço e tecidos linfoides associados à mucosa, todos eles são desenvolvidos durante o período larval (Biller-Takahashi et al., 2014; Press & Evensen, 1999).

O rim cefálico, nos peixes, pode ser comparado com a medula óssea, tem grande importância na hematopoiese, responsável pela formação de várias células, como os macrófagos, monócitos e granulócitos. O timo se localiza na região dorsolateral das brânquias (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014), onde ocorre o desenvolvimento e maturação dos linfócitos T (Bowden et al., 2015). Já o baço, é dividido em duas regiões, a polpa branca que está relacionada a formação das células de defesa, e a polpa vermelha responsável pela fagocitose das células anormais ou velhas, este órgão também está associado a formação de anticorpos (Press & Evensen, 1999; Rodrigues et al., 2020). Os tecidos linfoides associados a mucosas, que incluem pele e brânquias, são responsáveis pela produção de muco que contém importantes proteínas, como a lisozima e proteínas do sistema complemento, e são a barreira inicial contra os invasores (Dalmo et al., 1997).

Em peixes, assim como nos vertebrados superiores, as respostas imunológicas são divididas em inatas e adaptativas, e podem ser influenciadas por vários fatores, como micro e macronutrientes, agentes estressores, efeitos sazonais e hormonais (Fletcher, 1997), e estes dois sistemas atuam juntos para destruir invasores e desencadear vários mecanismos de defesa.

3.1. Sistema Imune Inato

O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa, mediada por barreiras químicas, físicas e por uma variedade de células e moléculas. Considerado o sistema mais antigo na escala filogenética, ele surgiu nos organismos unicelulares. O sistema inato reconhece porções (Pamps – Pathogen associated molecular patterns) provenientes de agentes infecciosos ou microrganismos da microbiota normal, tais como lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, DNA bacteriano ou RNA viral, ou ainda outras moléculas encontradas nas membranas de microrganismos multicelulares (“non-self”), não reconhecendo componentes do próprio organismo, pois os genes que codificam estes receptores (PRRs – Pattern recognition receptors) estão presentes no genoma do organismo. Os Pamps são normalmente porções altamente conservadas durante a evolução das espécies e estão presentes na maioria dos microrganismos (Janeway, 1989; Elward & Gasque, 2003; Goldsby et al., 2003).

Dentre os componentes do sistema imune inato está o tegumento, formado por pele e muco, sendo considerado a barreira inicial contra patógenos. Estes componentes são especializados em atuar contra a entrada de microrganismos nocivos. A superfície do corpo dos peixes funciona como uma barreira mecânica, com células especializadas que secretam componentes bactericidas responsáveis por impedir a entrada de microrganismos (Subramanian et al., 2007; Urbinati et al., 2020). Frequentemente, as barreiras do tegumento são suficientes para evitar a entrada de patógenos, porém, caso não sejam suficientes, e estes consigam penetrar nos tecidos e corrente sanguínea, componentes celulares e humorais irão reconhecê-los e atuar na tentativa de degradá-los (Ellis, 1999).

Componentes celulares são outro parâmetro importante do sistema imune inato, composto por células de defesa, como granulócitos, macrófagos e células natural killer. Os granulócitos são as primeiras células responsáveis por atingir o foco da inflamação e destruição dos patógenos, seguida pelos macrófagos que fagocitam os detritos celulares e células patogênicas. As células natural killers lisam células estranhas ou infectadas por vírus e produzem imunorreguladores de citocinas (Raulet, 2004; Magnadóttir, 2006; Urbinati et al., 2020). As células que possuem a capacidade de fagocitar e destruir o agente infeccioso são chamadas de fagócitos, e este mecanismo é muito importante, pelo papel de defesa do organismo contra infecções e participação nos processos

imunorregulatórios, limitando a disseminação de agentes infecciosos pelo organismo dos peixes (Ellis, 2001).

Durante as etapas da fagocitose, acontece uma importante etapa, chamada de explosão respiratória dos leucócitos, conhecida como “burst” oxidativo. Durante a fagocitose, o oxigênio é reduzido numa série de reações metabólicas intracelulares. Por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), há formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), substrato da enzima mieloperoxidase (MPO) liberada pelos leucócitos granulares, que gera a formação de hipoclorito e produção de cloramina. Esses radicais produzidos contribuem para a destruição de microrganismos (Verlhac et al., 1998).

Há também a ação de elementos humorais inatos, presentes em concentrações elevadas logo após a invasão de agentes patogênicos e são muito utilizadas como indicadores do sistema imune inato e no diagnóstico de doenças (Bayne & Gerwick, 2001). Os componentes humorais podem ser fatores inibidores do crescimento de bactérias, como exemplo, a transferrina, antiproteases, lisozima, proteína C reativa e proteínas do sistema complemento (Urbinati et al., 2020). Dentre estes, a lisozima é um importante mecanismo de defesa que promove proteção contra organismos invasores. Essa enzima tem a capacidade de lisar bactérias Gram positivas, Gram negativas, vírus e parasitas, e junto com proteínas do sistema complemento agem sobre bactérias Gram negativas (Alexander & Ingram, 1992). Em peixes, pode ser encontrada principalmente em tecidos que contém grande quantidade de leucócitos, principalmente neutrófilos, monócitos e macrófagos, sendo assim, sua maior concentração está no rim anterior, seguido do trato digestório, baço, muco, soro, brânquias, fígado e músculo (Murray & Fletcher, 1976).

O sistema complemento é considerado um dos mais importantes componentes de defesa do sistema inato, e é composto por um conjunto de proteínas solúveis no plasma, sendo o principal efetor do sistema imune humoral e mediador dos processos inflamatórios. Estas proteínas geralmente se encontram na forma inativa na circulação, e para que exerçam suas funções é necessário que ocorra sua ativação, de maneira sequencial, com efeito cascata (Biller-Takahashi et al., 2012; Urbinati et al., 2020). São três as diferentes vias que podem promover a ativação: a via clássica, a via alternativa e a via lectina (Holland & Lambris, 2002). Em peixes, a via alternativa, ativada por moléculas

de superfície de microrganismos, é a que ocorre mais comumente e demonstra a importância da resposta inata (Yano, 1996). Essas proteínas do sistema complemento podem atuar nos processos de quimiotaxia, quando acontece a lise celular e recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o local da infecção, de opsonização, para inativação das toxinas liberados pelos agentes patológicos e, por último, na fagocitose (Secombes, 1996).

Na maioria das vezes, as infecções são controladas por componentes do sistema imune inato, por macrófagos, neutrófilos e outras moléculas. Ao mesmo tempo, células deste sistema são responsáveis pela estimulação e ativação das respostas do sistema de defesa adaptativo (Wedemeyer, 1997).

Nos últimos anos, vem sendo discutido um novo conceito no campo da imunidade inata, que sugere que os mecanismos de proteção durante uma reinfecção ou proteção cruzada, podem não ser exclusivamente de respostas imunes adaptativas, esse conceito é chamado imunidade treinada, ou uma resposta imune inata aumentada. Esta, pode ser descrita por três critérios: (I) a imunidade treinada pode ser induzida após uma infecção primária ou imunização e, posteriormente, fornecer proteção contra uma infecção secundária de uma maneira independente de linfócitos T e B, (II) pode ser menos específico do que a resposta imune adaptativa, mas ainda demonstrar maiores respostas à resistência após a reinfecção do hospedeiro e (III) células inatas como, macrófagos e células natural killers, são os principais participantes do mecanismo, que envolve um melhor reconhecimento do patógeno e uma maior resposta inflamatória (Netea et al., 2011). Esse fenômeno sugere que a imunidade treinada possa ter um importante papel pronunciado no sistema imunológico dos peixes, mas ainda precisa ser mais investigado, para que se possa obter respostas específicas da sua ação em peixes (Petit & Wiegertjes, 2016).

3.2. Sistema imune adaptativo

O sistema imune adaptativo consiste em uma rede complexa de células, genes e mecanismos de sinalização celular, cuja função permite que os organismos respondam especificamente aos antígenos (Souza et al., 2019). Com a presença de um antígeno na corrente sanguínea, que pode ser uma célula ou uma

molécula estranha, há aumento de anticorpos específicos na circulação, e formação de uma memória imunológica, portanto a imunidade específica existe quando um organismo já sofreu alguma exposição anterior ao patógeno, porém o repertório de anticorpos desse sistema é limitado. Além disso, as respostas são consideradas lentas, podendo demorar semanas após a infecção para serem ativadas (Uribe et al., 2011).

A resposta adaptativa está dividida em resposta imune humoral e celular. A resposta humoral está associada aos anticorpos, que se ligam e marcam os agentes invasores para que eles sejam fagocitados (Ellis, 2001). Com a invasão dos microrganismo patogênicos no organismo dos peixes, os linfócitos B, que possuem em sua membrana receptores específicos para antígenos, se multiplicam e formam células que sofrem diferenciação, originando plasmócitos (linfócitos B ativados), responsáveis pela produção e liberação de anticorpos na corrente sanguínea (Goldsby et al., 2000), e células de memória que são capazes de memorizar a estrutura dos patógenos e elaborar respostas em novas reinfecções (Secombes, 1996).

A via celular é representada pelos linfócitos T (linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T supressores e linfócitos T memória). Após um patógeno ter invadido o organismo do animal e ter sido fagocitado por macrófagos, fragmentos celulares ligam-se a marcadores na superfície do macrófago, e os linfócitos T possuem a capacidade de reconhecer antígenos que se ligam a estes marcadores que irão secretar citocinas, proteínas que ativam outras células, como exemplo linfócito B, responsável pela produção de anticorpos, que terá como função a tentativa de destruição do agente invasor (Bernstein et al., 1998; Abbas & Lichman, 2004).

A ação conjunta dos dois sistemas, inato, como a primeira proteção do organismo, e adaptativo, como memória imunológica, é de extrema importância para garantir a sobrevivência e preservar a vida dos animais em ambientes aquáticos, que é repleto de microrganismos, estando susceptíveis a exposição aos patógenos.

4. IMUNOESTIMULANTES

Os aditivos imunoestimulantes podem ser definidos como substâncias

químicas, sintéticas ou biológicas, capazes de modular o sistema imunológico e aumentar a resistência do hospedeiro à doenças infecciosas causadas por patógenos (Bricknell & Dalmo, 2005). Dentre eles, podemos citar os polissacarídeos, componentes de bactérias, material biologicamente ativo, que pode promover uma forte resposta de defesa no hospedeiro (Mohapatra et al., 2013). O uso dos imunoestimulantes teve início na década de 80, pois estas substâncias apresentam ações como o aumento da duração da atividade da resposta imune inespecífica e por ter um modo de ação generalizado, pois não agem contra um organismo em específico, caracterizando seu poder profilático geral (Rodríguez et al., 2003).

Os imunoestimulantes podem atuar no sistema imune inespecífico, aumentando a atividade fagocítica e bactericida das células de defesa e no sistema imune específico. Além disso, podem ser utilizados como adjuvantes em vacinas para potencializar os resultados e caso haja falha na resposta à vacinação (Sahoo, 2007).

Em peixes, os imunoestimulantes podem aumentar a capacidade fagocítica de neutrófilos e linfócitos, estimular a secreção de citocinas e linfócitos, obter respostas de anticorpos e coordenar a imunidade celular e humoral. Além disso, o uso pode aumentar as taxas de crescimento, de sobrevivência e resistência a doenças, encontradas na aquicultura. Seus efeitos podem estar relacionados a diferentes fatores, como sua estrutura, o tempo e forma de administração (Bai et al., 2019).

Segundo o NCR (2011), os produtos microbianos ou micróbios inativados, como os lipopolissacarídeos, os β -glucanas, lactoferrina, peptidoglicanos, entre outros, podem estimular o sistema imune, destacando a importância de sua utilização na produção aquícola, uma vez que os manejos estressantes, tais como: seleção, despeca, vacinação e transporte, entre outros, podem causar imunossupressão e baixa resistência á patógenos, pois rompem o equilíbrio homeostático dos animais. Diante disso, o uso de imunoestimulantes tornou-se uma estratégia na aquicultura, pois tem a capacidade de minimizar os efeitos negativos do estresse no sistema imunológico dos peixes (Zanuzzo et al., 2017; de Mello et al., 2019).

É conhecido que os imunoestimulantes são uma importante ferramenta para a aquicultura, pois ao serem ofertados, por administração oral, antes de eventos

estressantes, promovem resultados satisfatórios, preparando o animal para futuras exposições a patógenos. As β -glucanas demonstraram ser importante imunestimulante, pois melhoram a saúde animal de duas maneiras, estimulando bactérias benéficas gastrointestinais e diretamente no sistema imunológico pela absorção no intestino delgado (Urbinati et al., 2020).

Entretanto, ainda são necessários mais estudos para melhor compreensão de diversos fatores como o mecanismo de ação, formas de administração, concentração adequada e período para ser ofertado. Além disso, deve-se levar em consideração a ação em diferentes estágios do desenvolvimento animal.

5. β -GLUCANA

Dentre os imunestimulantes, temos as β -glucanas, um polissacarídeo, macromolecular, formada por uma cadeia principal de unidades β -1,3 e β -1,6, que podem sofrer alterações e variações estruturais, dependendo da fonte e método de extração, podendo ter efeitos pró ou antiinflamatórios no sistema imunológico, além de ter diferentes funcionalidades nutricionais e de saúde (Pilarski et al., 2017). Estão amplamente distribuídas em bactérias, fungos, plantas e algas e são encontradas principalmente em cereais como a cevada e a aveia (Genc et al., 2001). As β -glucanas são utilizadas como ingredientes funcionais para produzir produtos nutricionais e saudáveis. Em humanos, por exemplo, reduzem o colesterol, além de possuir efeitos benéficos como a imunomodulação (Bai et al., 2019)

Na aquicultura, um dos imunestimulante mais utilizado é a β -glucana proveniente da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), que apresenta propriedades imunomodulatórias, antivirais, antimicrobianas, antiparasitárias (Wasser & Weis, 1999), além de melhorar o ambiente intestinal (Irianto & Austin, 2002). Segundo Montoya et al. (2017), β -glucana modulou o perfil do cortisol e aumentou a mobilização e atividade dos leucócitos em matrinxãs, demonstrando desencadear um mecanismo importante, melhorando a resposta imune inata dos peixes. de Mello et al. (2019) observaram em pacus, alimentados com 0,1% de β -glucano, e que foram estressados pelo manejo de transporte, níveis de cortisol diminuídos, sugerindo que o composto teve um efeito protetor evitando níveis elevados do hormônio, evidenciando seu efeito

imunomodulador.

Existem algumas formas de administração da β -glucana, como exemplo, administração oral, injeção intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea e banhos de imersão. O método mais utilizado na aquicultura é administração oral, que apesar de ter um efeito menos intenso, se comparado com métodos injetáveis, é o mais prático, por não ser estressante, já que é oferecido via ração, além demonstrar efeitos profiláticos, efeitos imunomoduladores significativos e modificar a composição da microbiota intestinal (Rodrigues et al., 2020).

O método de injeção, que apesar de não ter grande custo benefício, uma vez que depende de mão de obra qualificada e de causar estresse no manejo, é bastante eficaz em estimular o sistema imunológico, além de ser utilizado como adjuvante em vacinas e induzir efeitos de longa vida nos peixes. Estudo de Guselle et al. (2010) demonstrou que uma única dose intraperitoneal de β -glucana, em truta arco-íris, resultou em proteção contra infecção por *Loma salmonae*, semelhante a resultados obtidos com alimentação, que utilizou concentrações 10 vezes maiores de β -glucana. Os banhos de imersão também são uma alternativa promissora, uma vez que banhos com β -glucana melhoraram significativamente a cicatrização de feridas na pele de carpa (Przybylska et al., 2013).

Estruturas presentes na β -glucana, os PAMPs - Padrão Molecular Associado aos Patógenos - possuem afinidade para Receptores de Reconhecimento Padrão, os PRRs, e essa interação constitui um importante aspecto de resposta imune, pois a partir disso ocorre a estimulação das células imunológicas (Palti, 2011). Com a ativação do sistema imune, há uma melhora na atividade fagocítica e citotóxica nos macrófagos (Tsiapali et al., 2001).

Em mamíferos, a β -glucana ativa a imunidade inata, pois possui ligação ao receptor específico de β -glucana, dectina-1 em macrófagos, que pode estimular a atividade fagocítica e aumentar a atividade respiratório dos leucócitos, além disso, também ativa células imunes adaptativas, como células B, T, células natural killers, eosinófilos e neutrófilos (Batbayar et al., 2012). Nos teleósteos, sabe-se que os TLRs, são receptores que desencadeiam respostas imunes inatas, ativando vias de sinalização (Zhou et al., 2018). Para a ativação da β -glucana, alguns estudos sugeriram como receptores de reconhecimento, a proteína C3 do complemento, lectinas, membros da família CLR, e receptores

como TLR2 (Pietretti & Wiegertjes, 2014), e o efeito do uso da β -glucana como um imunostimulante, é bem semelhante aos obtidos pelos mamíferos (Rodrigues et al., 2020).

Apesar dos efeitos imunomoduladores da β -glucana, essas respostas podem variar e estudos sobre a dose e o tempo de administração adequado são necessários. Alguns autores sugerem que baixas concentrações de β -glucana administradas por um período curto favorecem a resposta imune, já altas concentrações oferecidas por longos períodos provocam o efeito inverso, reduzindo a resposta imune, por causar uma exaustão do sistema imune (Robertsen et al., 1994; Castro et al., 1999). Isso foi demonstrado em trabalho de Chagas et al. (2013), com a espécie tambaqui (*Colossoma macropomum*), no qual foram utilizadas diversas doses de β -glucana (0, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8%) nas dietas, por 60 dias, e os peixes desafiados com *A. hydrophila*. Houve maior taxa de mortalidade após o desafio nas maiores concentrações da β -glucana (0,4 e 0,8%). Recentemente, Koch et al. (2021) demonstraram resultados importantes para a aquicultura. Tilápias foram alimentadas, por 0, 15, 30 e 45 dias, com dietas contendo 0,1% de β -glucana, e 10 dias depois da retirada do produto realizaram infecção com *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae*, os animais alimentados com o imunostimulante por 45 dias, apresentaram maior taxa de sobrevivência quando se comparado a qualquer outro grupo. Além disso o estudo demonstrou que independente do período de administração, a β -glucana melhorou as respostas imunes inatas, refutando as hipóteses descritas anteriormente.

Estudos recentes estão demonstrando que o uso de β -glucana pode ter efeitos por períodos mais longos, após a retirada do imunostimulante, que pode ser explicado pela imunidade treinada. Petit & Wiegertjes (2016) demonstraram uma série de informações e estudos que indicam efeitos de longa duração estimulados pelo uso de β -glucana, possivelmente com base para macrófagos. Garoupas alimentadas com uma dieta contendo uma mistura de β -glucana de cogumelo por 12 dias apresentaram maior proteção à infecção por *Vibrio alginolyticus*, 15 dias após a retirada da ração com glucana e alimentadas com ração controle (Chang et al., 2013).

Com essas evidências, é necessário que sejam feitos estudos sobre os períodos de uso de β -glucana e encontrar mais respostas sobre a ação do

imunoestimulante na imunidade treinada.

6. LPS (Lipopolissacarídeo)

O lipopolissacarídeo é denominado de endotoxina ou pirógeno, no entanto na literatura relacionada à aquicultura o termo LPS é mais comum (Swain et al., 2008). O LPS é uma molécula complexa de lipopolissacarídeos presente na parede celular de bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas (Wexler & Oppenheim, 1979). Estas moléculas são liberadas após a destruição das bactérias e são capazes de causar respostas imunológicas potentes, tais como respostas inatas pró-inflamatórias (Morrison et al., 1985; Morrison & Ryan, 1987; Swain et al., 2008).

Em mamíferos, o LPS pode ser responsável por efeitos negativos como coagulação intravascular disseminada, hipotensão, choque e morte, porém em vertebrados basais, como anfíbios e peixes, as respostas são diferentes uma vez que estes são mais tolerantes aos efeitos adversos do LPS. Quando aplicado em pequenas quantidades tem a capacidade de estimular a formação de espécies reativas de oxigênio, ativação dos macrófagos e proliferação de linfócitos B (Sakai, 1999; Sarmiento et al., 2004). Foi observado também que o LPS pode aumentar os níveis circulantes de cortisol, proteína C reativa (CRP) e induzir a produção de componente C3 do sistema complemento em peixes. Porém, segundo White et al. (1984), as modificações e respostas que o LPS pode causar dependem de alguns fatores como a fonte de lipopolissacarídeo utilizada, o método empregado para seu isolamento e a via de aplicação da endotoxina.

Estudo realizado por Ha (2016), no qual tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram desafiadas por injeção intraperitoneal da endotoxina LPS (500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peixe), indicou que LPS induziu uma resposta imune, como a atividade da lisozima e a explosão respiratória dos leucócitos, sugerindo que a endotoxina é considerada eficaz para desafios imunológicos.

O uso do LPS também mostrou resultados, em um trabalho realizado por Sousa (2020), no qual foram testados diversos níveis de carboidratos e proteínas nas dietas de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* \times *P. corruscans*), que posteriormente foram desafiados com o lipopolissacarídeo. Observou-se que a

maioria das variáveis hematológicas aumentaram, demonstrando o potencial da endotoxina, como desafio imunológico.

Com essas características do LPS, o mesmo vem sendo estudado e utilizado como um ativador, capaz de promover inflamação e imunomodulação em peixes e vem sendo uma boa alternativa para induzir a imunidade.

7. PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

O modelo biológico escolhido para este estudo foi o *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887), popularmente conhecido como pacu, da família *Characidae*. É uma espécie de grande representatividade e importância entre os peixes nativos pelo seu valor comercial na aquicultura, além de exibir um comportamento alimentar adaptativo e suportar longos períodos de restrição alimentar (Favero et al., 2018). É natural da América do Sul, sendo encontrado com maior frequência nas bacias dos rios Paraná, Uruguai e Paraguai. No Brasil, sua maior distribuição está concentrada no Centro-Oeste, Mato Grosso e Pantanal (Petrere Jr, 1989).

O pacu tem o hábito alimentar onívoro, preferencialmente frugívoro (Urbinati & Takahashi, 2020), porém apresenta boa aceitação de rações artificiais, o que garante sucesso na produção. Além dessa característica, somada a outras, como ganho de peso elevado, rusticidade, facilidade de adaptação em sistema de criação em tanques e viveiros (Jomori et al., 2008), o pacu ainda tem um papel de extrema importância na regeneração das florestas, como importantes dispersores de sementes (Galetti et al., 2008).

Assim, a espécie vem sendo cada vez mais produzida devido suas características positivas e carne branca de excelente qualidade, e conseqüentemente cresce a preocupação dos produtores em melhorar os ambientes de criação, uma vez que estes podem causar estresse, levando a várias mudanças fisiológicas nos animais, que tentam compensar os desafios, para conseguir passar pelo estresse que lhe foi imposto (Abreu et al., 2009).

Sendo assim, é de extrema importância para a criação, a adoção de boas práticas de manejo, entre elas a inclusão de imunoestimulantes nas rações, que minimizam os efeitos estressores e melhoram as respostas frente a possíveis infecções, modulando o sistema imune do animal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHMAN, A.H. **Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system.** W. B. Saunders. 2004.
- ABREU, J.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L.M.; URBINATI, E.C. **Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Brazilian Journal of Biology, v.69, n.4, p. 1133-1139, 2009.
- ALEXANDER, J.B.; INGRAM, G.A. **Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish.** Annual Review of Fish Diseases, v. 2, p. 249-279, 1992.
- BAI, J.; REN, Y.; LI, Y.; FAN, M.; QIAN, H.; WANG, L.; WU, G.; ZHANG, H.; QI, X.; XU, M.; RAO, Z. **Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans.** Trends in Food Science & Technology, v. 88, p. 57-66, 2019
- BATBAYAR, S.; LEE, D.H.; KIM, H.W. **Immunomodulation of fungal β -glucan in host defense signaling by dectin-1.** Biomolecules & Therapeutics, v. 20, n. 5, p. 433, 2012.
- BAYNE, C.J.; GERWICK, L. **The acute phase response and innate immunity of fish.** Developmental and Comparative Immunology, v.25, n.8-9, p.725-43, 2001.
- BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. **Immunity.** In: **EVANS, D.H. The physiology of fishes.** 2ed. Boca Raton: CRC Press, p.215-242, 1998.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **Hemolytic activity of alternative complement system as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Revista Brasileira de Zootecnia, v.41, n.2, p.237-241, 2012.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **Disease of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β -glucan.** Brazilian Journal of Biology, v.74, n.3, p.698- 703, 2014.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; URBINATI, E.C. **Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies.** Anais da Academia Brasileira de Ciência, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1484-1506, 2014.
- BOWDEN, T.J.; COOK, P.; ROMBOUT, J.H.W.M. **Development and function of the thymus in teleosts.** Fish & Shellfish Immunology, v.19, p.413-427, 2015.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. **The use of immunostimulants in fish larval aquaculture.** Fish & Shellfish Immunology, v. 19, n. 5, p. 457-472, 2005.
- CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. **Effect of different beta- glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes.** Fish & Shellfish Immunology, v. 9, n. 7, p. 529-541, 1999.
- CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MORAES, F.R. **Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração suplementada com β -glucano.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 48, n. 8, p. 899-905, 2013.
- CHANG, C. S.; HUANG, S. L.; CHEN, S.; CHEN, S. N. **Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, aquaculture.** Fish & shellfish immunology, v. 35, n. 1, p. 115-125, 2013.

CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A.; FARIA, P.M.C.; RIBEIRO, L.P.; MELO, D.C.; CARVALHO, D.; SOUSA, A.B.; SATURNINO, H.M. **Sistemas de produção na piscicultura**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.30, n.3-4, p.86-99, 2006.

DALMO, R.A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. **Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES)**. Journal of Fish Diseases, v. 20, n. 4, p. 241-273, 1997.

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

ELLIS, A.E. **Immunity to bacteria in fish**. Fish and Shellfish Immunology, v. 9, n. 4, p. 291-308, 1999.

ELLIS, A.E. **Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria**. Developmental and Comparative Immunology, v. 25, n. 8-9, p. 827-839, 2001

ELWARD, K.; GASQUE, P. **“Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system**. Molecular Immunology, v. 40, n. 2-4, p. 85-94, 2003.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200p ISBN 978-92-5-109185-2, 2020.

FAVERO, G.C., GIMBO, R.Y., FRANCO MONTOYA, L.N., ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Aquaculture Research, v. 49, n. 1, p. 359-366, 2018.

FLETCHER, T.C. **Dietary effects on stress and health**. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPETER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: University Press, v. 62, p. 223-246, 1997

GALETTI M.; DONATTI C.I.; PIZO M.A.; GIACOMINI H.C. **Big fish are the best: seed dispersal of *Bactris glaucescens* by the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in the Pantanal, Brazil**. Biotropica, v. 40, n. 3, p. 386-389, 2008.

GENC, H.; OZDEMIR, M.; DEMIRBAS, A. **Analysis of mixed-linked (1-3), (1-4)- β -D-glucans in cereals grains from Turkey**. Food Chemistry, v.73, n.3, p.221-224, 2001.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A.; KUBY, J. **Cells and organs of the immune system**. Kuby immunology, v. 4, p. 27-59, 2000.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A.; KUBY, J., **Immunology**, W.H. Freeman and Company, New York, p.551, 2003.

GUSELLE, N.J.; SPEARE, D.J.; MARKHAM R.J.F.; PATELAKIS N.S. **Efficacy of intraperitoneally and orally administered ProVale, a yeast beta-(1,3)/(1,6) D-glucan product, in inhibiting Xenoma formation by the microsporidian *Loma salmonae* on rainbow Trout gills**. North American Journal of Aquaculture, v. 72, n. 1, p. 65-72, 2010.

HA, N.; GONÇALVES, A. F. N.; SOUSA, L. C.; BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S. **Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation**. Aquaculture International, v. 25, n. 2, p. 755-776, 2017.

HOLLAND, M.C.; LAMBRIS, J.D. **The complement system in teleosts**. Fish & Shellfish Immunology, v. 12, n. 5, p. 399-420, 2002.

- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. **Probiotics in aquaculture.** *Journal of Fish Diseases*, Edinburgh, v. 25, n. 11, p. 633-642, 2002.
- JANEWAY, C. **Immunogenicity signals.** *Immunology Today*, v. 10, n. 9, p. 283-286, 1989.
- JOMORI R.K.; DUCATTI C.; CARNEIRO D.J.; PORTELLA M.C. **Stable carbon (13C) and nitrogen (d15N) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue.** *Aquaculture Research*, v. 39, n. 4, p. 370-381, 2008.
- 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*, v. 112, p. 56-63, 2021.
- MAGNADÓTTIR, B. **Innate immunity of fish (overview).** *Fish & Shellfish Immunology*, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.
- MOHAPATRA S.; CHAKRABORTY T.; KUMAR V.; DEBOECK G; MOHANTA K.N. **Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 97, n. 3, p. 405-430, 2013.
- MONTOYA, L.N.F.; MARTINS, T.P.; GIMBO, R. Y.; ZANUZZO F.S.; URBINATI, E.C. **Glucan-induced cortisol levels improve the early immune response in matrinxã (*Brycon amazonicus*).** *Fish & Shellfish Immunology*, v. 60, p. 197-204, 2017.
- MORRISON, D.C.; DUCAN, R.L.; GOODMAN, S.A. **In vivo biological activities of endotoxin.** *Progress in Clinical and Biological Research*, v. 189, p. 81-99, 1985.
- MORRISON, D.C.; RYAN, J.L. **Endotoxin and disease mechanism.** *Annual Review of Medicine*, v. 38, n. 1, p. 417-432, 1987.
- MURRAY, C.K.; FLETCHER, T.C. **The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues.** *Journal of Fish Biology*, v. 9, n. 4, p. 329-334, 1976.
- NCR (National Research Council). **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.** National Academic Press, Washington, DC, USA, 2011.
- NETEA, M.G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W.M. **Trained immunity: a memory for innate host defense.** *Cell Host & Microbe*, v. 9, n. 5, p. 355-361, 2011.
- PALTI, Y. **Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function.** *Dev. Developmental & Comparative Immunology*, v. 35, n. 12, p. 1263-1272, 2011.
- PARK, Y.H.; HWANG, S.Y.; HONG M.K., KWON, K.H. **Use of antimicrobial agents in aquaculture.** *Revue Scientifique Et. Technique*, v. 31, n. 1, p. 189-197, 2012
- PEIXE BR. **Anuário PeixeBr da Piscicultura 2020.**
- PETIT, J.; WIEGERTJES, G.F. **Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish.** *Developmental and Comparative Immunology*, v. 64, p. 93-102, 2016.
- PETRERE JR, J.R.M. **River fisheries in Brazil: a review.** *Regulated Rivers: Research and Management*, v. 4, n. 1, p. 1-16, 1989.
- PIETRETTI, D.; WIEGERTJES, G.F. **Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies.** *Developmental & Comparative Immunology*, v. 43, n. 2, p. 205-222, 2014.

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, v. 70, p. 25-29, 2017.

PRESS, C.M.; EVENSEN, O. **The morphology of the immune system in teleost fishes**. Fish & Shellfish Immunology, v. 9, n. 4, p. 309-318, 1999

PRZYBYLSKA-DIAZ, D.A.; SCHMIDT, J.G.; VERA JIMENEZ, N.I.; STEINHAGEN, D.; NIELSEN, M.E. **Beta-glucan enriched bath directly stimulates the wound healing process in common carp (*Cyprinus carpio* L)**. Fish & Shellfish Immunology, v.35, pp. 998-1006, 2013.

RAULET, D.H. **Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response**. Nature Immunology, v. 5, n. 10, p. 996-1002, 2004

RIGOS, G.; TYRPENOU, A.E.; NENGAS, I.; ALEXIS, M.; ATHANASSOPOULOU, F.; TROISI, G.M. **Erratum to “Poor bioavailability of oxytetracycline in sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo*”**. Aquaculture, v. 235, n. 1-4, p. 489-497, 2004.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.E.; JORGENSEN, J.B. **β -glucans as immunostimulators in fish**. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T. (Ed.). **Modulators of Fish Immune Responses**. Fair Haven VT, SOS Publications, v. 1, p. 83-99, 1994.

RODRIGUES, M.V.; ZANUZZO, F.S.; KOCH, J.F.A.; DE OLIVEIRA, C.A.F.; SIMA, P.; VETVICKA, V. **Development of fish immunity and the role of β -glucan in immune responses**. Molecules, v. 25, n. 22, p. 5378, 2020.

RODRÍGUEZ, F.; ESTEBAN, M.; MESEGUER, J.; BRAVO, M.; GÓMEZ, G.; ROJAS-LUNA, T.; JIMÉNEZ, G.; BALCÁZAR, J. **Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura**. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA, p. 624-654, 2003.

ROMERO, J.; FEIJOÓ, C.G.; NAVARRETE, P. **Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives**. In Health and Environment in Aquaculture, v. 159, p.159-198, 2012.

SAHOO, P. K. **Role of immunostimulants in disease resistance of fish**. CAB reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, v. 2, n. 045, 2007.

SAKAI, M. **Current research status of fish immunostimulants**. Aquaculture, Oxford, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.

SARMENTO, A.; MARQUES, F.; ELLIS, A.E.; AFONSO, A. **Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide**. Fish & Shellfish Immunology, v. 16, n. 2, p. 79-92, 2004.

SECOMBES, C.J. **The nonspecific immune system: cellular defenses**. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). The fish immune system, v. 15, p. 63-103, 1996.

SOUZA, L.C.; MOROMIZATO, B.S.; ALMEIDA, V. N. S.; MIYASAKI, C. T.; TAKAHASHI, L. S.; BILLER, J. D. **There is more than one way of feeding carnivorous fish: *Surubim* (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *P. corruscans*) are able to cope with carbohydrates rich diets, but there is a trade-off between growth and immunity**. Animal Feed Science and Technology, v. 262, p. 114-382, 2020.

SOUZA, D.C.M.; SANTOS, M.C.; CHAGAS, E.C. **Immune response of teleost fish to helminth parasite infection**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 28, n. 4, p. 533-547, 2019.

- SUBRAMANIAN, S.; MACKINNON, S.L.; ROSS, N.W. **A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species.** Comparative Biochemistry and Physiology, v. 148, n. 3, p. 256-263, 2007.
- SWAIN P.; NAYAK S.K.; NANDA P.K.; DASH S. **Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review.** Fish & Shellfish Immunology, v. 25, n. 3, p. 191-201, 2008.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. **An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms.** Journal of Parasitic Diseases, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017.
- TORT, L. **Stress and immune modulation in fish.** Developmental & Comparative Immunology, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.
- TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; ENSLEY, H.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D.L. **Glucans and related natural polymers exhibit weak solution free radical scavenging activity, but stimulate free radical activity in a murine macrophage cell line.** Free Radical Biology and Medicine, v.30, p.393-402, 2001.
- URBINATI, E.C.; TAKAHASHI, L. S. **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** In: Bernardo Baldisserotto. (Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 3ed.Santa Maria: Editora UFSM, v. 1, p. 169-191, 2020.
- URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; BILLER, J. D. **Stress and immune system in fish.** Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish. 1ed.: Academic Press - Elsevier, v. 1, p. 1-358, 2020.
- URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRÍQUEZ, R.; MORAN, G.J.V.M. **Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review.** Veterinarni Medicina, v. 56, n. 10, p. 486, 2011.
- VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. **Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Fish & Shellfish Immunology, v. 8, n. 6, p. 409-424, 1998.
- WANG, W.; SUN, J.; LIU, C.; XUE, Z. **Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives.** Aquaculture Research, v. 48, n. 1, p. 1-23, 2017.
- WASSER, S. P.; WEIS, A. L. **Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective.** Critical Reviews in Immunology, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.
- WEDEMEYER, G. A. **Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture.** Fish stress and health in aquaculture, p. 35-71, 1997.
- WEXLER, H.; OPPENHEIM, J. D. **Isolation, characterization, and biological properties of an endotoxin-like material from the Gram-positive organism *Listeria monocytogenes*.** Infection and Immunity, v. 23, n. 3, p. 845-857, 1979.
- WHITE, P.J.; GASTON, M.A.; WILKINSON, S.G. **Composition of O-antigenic lipopolysaccharides from *Enterobacter cloacae*.** Microbiology and Immunology, v. 28, n. 11, p. 1169-1179, 1984.
- YANO, T. **The non-specific immune system.** In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. San Diego, California: Academic Press, p.105-157, 1996.

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

ZHOU, Z.; LIN, Z.; PANG, X.; SHAN, P.; WANG, J. MicroRNA regulation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. ***Fish & shellfish immunology***, v. 75, p. 32-40, 2018.

ZHU, L.Y.; PAN, P.P.; FANG, W.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X. **Essential Role of IL-4 and IL-4R α Interaction in Adaptive Immunity of Zebrafish: Insight into the Origin of Th2-like Regulatory Mechanism in Ancient Vertebrates.** *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 11, p. 5571-5584, 2012.

CAPÍTULO 2

DURAÇÃO DO EFEITO IMUNOESTIMULANTE DA GLUCANA PÓS ADMINISTRAÇÃO EM PACU.

RESUMO

Com o crescimento na produção de peixes nativos, a indústria aquícola tem utilizado manejos de rotina mais intensos, em geral, estressantes, que afetam o equilíbrio fisiológico dos animais e podem levar a prejuízos no desempenho e aumento da suscetibilidade às doenças. Assim, é recomendável a adoção de manejos preventivos, como a inclusão de imunoestimulantes na alimentação dos peixes, como a β -glucana. Esta proposta avaliou o tempo de ação da β -glucana como promotor da imunidade inata em pacu. Os peixes, estocados em 16 caixas (10 peixes/caixa), foram distribuídos em diferentes tratamentos. Após 15 dias de alimentação, peixes de quatro caixas de cada tratamento foram amostrados. A partir deste dia, todos os peixes receberam a dieta controle. Após outros 15 dias, as amostragens se repetiram (quatro controle e quatro glucana). Em cada amostragem, o sangue foi retirado para determinação dos indicadores de estresse (glicose e cortisol plasmáticos) e os indicadores de imunidade inata (atividade respiratória de leucócitos, atividade sérica do sistema complemento, concentração sérica da lisozima). Em seguida, os peixes foram inoculados experimentalmente com LPS e amostrados 3, 6 e 24 h depois para determinação dos indicadores citados. Em cada coleta, foram registrados os dados de peso corporal para avaliação do crescimento dos peixes ao longo do experimento. A β -glucana não afetou o peso dos peixes e os indicadores de estresse e da imunidade inata, nas condições experimentais deste estudo. A inoculação dos peixes com o LPS, na concentração utilizada ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$), não afetou a resposta imune inata do pacu.

Palavras chave: Imunomodulação, lipopolissacarídeo, β -glucana, sistema imune.

ABSTRACT

With the growth in the production of native fish, the aquaculture industry has used more intense routine managements, in general, stressful, which affect the physiological balance of the animals and can lead to losses in productive performance and increased susceptibility to diseases. Thus, it is recommended the adoption of preventive managements, such as the inclusion of immunostimulants in fish feed, such as β -glucan, with proven action. This proposal aimed to evaluate the time of action of β -glucan as a promoter of innate immunity in pacu. The fish were stored in 16 boxes (10 fish/box), being distributed in different treatment groups. After 15 days of feeding, fish from four boxes of each treatment were sampled. From this day on, all fish received the control diet. After another 15 days, the samplings were repeated in the remaining boxes (four control and four glucan). In each sample, blood was taken to determine stress indicators (plasma glucose and cortisol) and innate immunity indicators (respiratory activity of leukocytes, serum activity of the complement system, serum concentration of lysozyme). Then, the fish were experimentally inoculated with LPS and sampled 3, 6 and 24 h later to determine the aforementioned indicators. In each collection, body weight data were recorded to assess fish growth throughout the experiment. The experiment was carried out in a completely randomized design. β -glucan did not affect fish weight and stress indicators and innate immunity under the experimental conditions of this study. The inoculation of fish with LPS, at the concentration used ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$), did not affect the pacu's innate immune response.

Keywords: Immunomodulation, lipopolysaccharide, β -glucan, immune system.

1. INTRODUÇÃO

O cenário atual da aquicultura é muito promissor. Desde a década de 80, a produção de organismos aquáticos vem crescendo, às custas do aumento no número de produtores, maior procura por proteína de origem animal de qualidade pela população e o maior investimento em tecnologia de produção. No entanto, com o aumento da produção, surgiram problemas relacionados a saúde dos animais, uma vez que passaram a ser estocados em altas densidades, a passarem por inúmeros manejos físicos e condições ambientais alteradas, que geram estresse e causam imunossupressão, levando-os a ficarem susceptíveis a patógenos oportunistas (Liu et al., 2015; Tort, 2011).

Para tentar combater as doenças, o setor produtivo passou a fazer uso de antibióticos e quimioterápicos, procedimento muito questionado na atualidade, já que pode causar resistência bacteriana, deixar resíduos na carcaça do animal e gerar problemas na comercialização (Romero et al., 2012). Uma alternativa ao uso destes produtos é o uso de imunostimulantes, compostos que modulam o sistema imunológico e aumentam a resistência dos hospedeiros contra patógenos (Dawood et al., 2018). Os imunostimulantes são substâncias, que tem a capacidade de melhorar o mecanismo de defesa do animal, ativando uma proteção precoce contra patógenos (Selvaraj et al., 2005; Vallejos-Vidal et al., 2016).

Entre os imunostimulantes, temos as β -glucanas, macromoléculas formadas por blocos de glicose conectadas por ligações β -1,3 e cadeias laterais por ligações β -1,6. São capazes de ativar a resposta imune, fornecendo aos animais maior resistência a patógenos (Rodrigues et al., 2020). O imunostimulante modula o sistema imune do animal, aumentando a atividade fagocítica e a produção de proteínas líticas, como a lisozima e de proteínas do sistema complemento (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014). Entretanto, mais estudos são necessários para se conhecer o tempo de atuação da β -glucana, após sua

administração. Nos últimos anos, estudos vêm discutindo o conceito de imunidade treinada, que sugere que os mecanismos de proteção durante uma reinfecção ou proteção cruzada, podem não ser exclusivamente de respostas imunes adaptativas, o que pode ter um importante papel pronunciado no sistema imunológico dos peixes (Petit & Wiegertjes, 2016).

O peixe alvo de nosso estudo é o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), uma das mais importantes espécies nativas de importância econômica (Valladão et al., 2018). Porém, com o aumento da produção e a falta de biossegurança, a espécie vem enfrentando a ocorrência de doenças, como a infecção por diversos patógenos, que podem causar perdas significativas na produção. Neste contexto, o trabalho avaliou o tempo de atuação do imunoestimulante β -glucana, em pacu, com o intuito de se conhecer o tempo adequado de utilização deste imunoestimulante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e protocolo experimental

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o Protocolo – 08380/19, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

O experimento foi realizado no Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), câmpus de Jaboticabal. Foram utilizados 160 juvenis de pacus (90 ± 21 g). Os peixes foram mantidos em 16 caixas de polietileno de 1000L (10 peixes/caixa), em um sistema fechado de recirculação de água e aeração suplementar. Durante o período experimental, a água das caixas apresentou temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e concentração de oxigênio dissolvido de $6,56 \pm 0,27$ mg L⁻¹.

Os peixes foram mantidos no sistema, em aclimatação, por sete dias, recebendo ração controle. Após esse período, foi realizada uma biometria inicial, quando os animais foram distribuídos nos seguintes tratamentos: Grupo controle – alimentados com ração comercial sem a adição de β -glucana; Grupo tratamento – alimentados com ração comercial com adição de 0,1% de β -glucana. Os animais foram alimentados por 15 dias, às 10h e 16h, recebendo

alimentação até a saciedade aparente. Cada tratamento continha 8 réplicas (80 peixes/tratamento). Após 15 dias de alimentação, peixes de 4 caixas de cada tratamento foram pesados e amostrados (2 peixes por caixa, $n=8$). A partir deste dia, os peixes das outras 8 caixas passaram a receber a dieta controle. Após outros 15 dias, as pesagens e amostragens se repetiram, sendo 8 caixas (quatro controle e quatro glucana, $n=8$). Em cada dia de amostragem, os animais foram anestesiados com benzocaína, pesados e coletado material biológico para determinação de indicadores de estresse (concentração plasmática de glicose e cortisol) e de indicadores de imunidade inata (atividade respiratória de leucócitos, atividade sérica do sistema complemento, concentração sérica da lisozima). Em seguida, os peixes foram inoculados com injeção intraperitoneal com $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de LPS de *E. coli* (O26:B6, Sigma, código L3755, lote #039M4014V) dissolvidos em solução salina a 0,6%, em volume $0,01 \text{ ml g}^{-1}$ de peixe, e amostrados novamente 3h, 6h e 24h pós desafio (2 peixes por caixa, $n=8$).

2.2. Desenho experimental

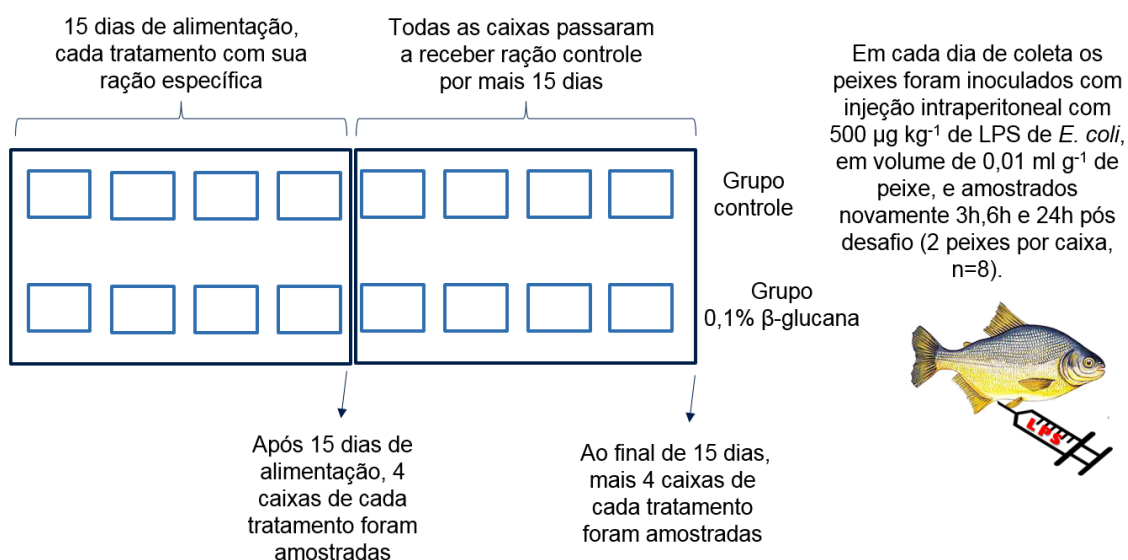


Figura 1. Desenho experimental do projeto.

2.3. Processamento da ração

As dietas foram preparadas pela moagem de ração comercial extrudada (28% PB e 3600 Kcal EB/kg) e misturada com 0,1% de β -glucana (Macrogard®, lote Q719120 - 1000423), fornecido pela empresa Biorigin, Brasil. Após a adição

do imunostimulante na ração farelada, a dieta foi umedecida com 40% de água, a mistura foi homogeneizada e em seguida granulada em moedor manual para a confecção dos granulos, que ficaram em estufa para serem secos por 24 horas.

2.4. Coletas e análises laboratoriais

Em todas as amostragens, os animais foram anestesiados com benzocaína (50mg/L), pesados e o sangue retirado por punção do vaso caudal foi separado em microtubos que continham ou não anticoagulantes, para a realização das análises.

2.4.1 Indicadores de estresse

Em microtubos com ácido etilenodiaminotetracético, EDTA fluoretado (Glistab – Labtest), foi alicotado sangue para a extração do plasma e quantificação da concentração de cortisol e de glicose com kits comerciais [(Cortisol ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – 1887), (Labtest Ref.133 e DRG, respectivamente)].

2.4.2 Indicadores de imunidade inata

Já em microtubos com heparina, foram colocadas alíquotas de sangue total para a determinação da atividade respiratória de leucócitos, de acordo com protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado para o pacu (Biller-Takahashi et al., 2013). O método consiste na determinação colorimétrica das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo, baseado na redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Genesys 10S UV-Vis) em comprimento de onda de 540nm.

Parte do sangue foi mantida à temperatura ambiente em tubos de vidro por quatro horas para separação do soro, que foi utilizado para determinação da atividade hemolítica do sistema complemento e a concentração sérica da lisozima.

A atividade hemolítica da via alternativa (HA-AP) do complemento sérico foi

medida de acordo com Ferriani et al. (1990) e Polhill et al. (1978) com algumas modificações para uso com sangue de pacu de acordo com Zanuzzo et al. (2017). A atividade hemolítica da via alternativa do complemento sérico foi medida como o tempo em segundos necessário para a densidade óptica inicial (0,7 a 700nm) da suspensão RaRBCs ser reduzida pela metade (~ 0,35 a 700nm) representando 50% de hemólise mediada pelo complemento do soro. Por fim, para obter a atividade hemolítica da via alternativa, utilizou-se: HA-AP = tempo para obter 50% de hemólise (segundos).

A concentração de lisozima sérica foi determinada com base na lise da bactéria Gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* de acordo com Demers e Bayne (1997) com modificações por Zanuzzo et al. (2017). Soluções padrão de lisozima de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil; L6876) e amostras de soro foram colocadas em uma placa de 96 poços em triplicata com uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil; M3770). Após a mistura, a absorvância foi medida a 450 nm ao longo de 10 min usando um leitor de microplaca (Multiskan Ascent Model, Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, EUA) à temperatura ambiente. A taxa de diminuição da absorvância para cada amostra foi então comparada e obtida com a curva padrão ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$).

2.5. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando as funções lme e anova do pacote nlme (Pinheiro et al., 2020) do software R (R Core Team, 2020). Delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 (períodos experimentais, i.e. efeito longitudinal) x 2 (dietas), para variável peso [Eq. 1], e esquema fatorial 3 (períodos experimentais) x 4 (horários de coleta, i.e. efeito longitudinal) x 2 (dietas), para as demais variáveis [Eq. 2], foram utilizados, conforme modelos a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + P_j + (DP)_{ij} + b_{ij:k} + e_{ijk} \quad [1]$$

Onde Y_{ijk} é a variável dependente, μ é a média geral, D_i é o efeito fixo de dieta, P_j é o efeito fixo de período experimental, $(DP)_{ij}$ é a interação entre D_i e P_j , $b_{ij:k} \sim \text{iid } N(0, \sigma_b^2)$ é o efeito aleatório da k -ésima caixa dentro da interação

$(DP)_{ij}$, e_{ijk} é o efeito aleatório de erro residual $e_{ik} \sim N(0, R)$, onde R é estrutura de correlação de e_{jk} . Foram avaliadas as R geral (σ^2), simétrica composta, autorregressiva de ordem 1 e autorregressiva de ordem 1 heterogênea. O critério de informação de Akaike, corrigido para pequenas amostras (Sugiura, 1978), foi utilizado para escolha da melhor R .

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + P_j + b_{ij:k} + C_l + (DP)_{ij} + (DC)_{il} + (PC)_{jl} + (DPC)_{ijl} + e_{ijkl} \quad [2]$$

Onde Y_{ijkl} é a variável dependente, μ é a média geral, D_i é o efeito fixo de dieta, P_j é o efeito fixo de período experimental, $b_{ij:k} \sim \text{iid}N(0, \sigma^2)$ é o efeito aleatório da k -ésima caixa dentro da interação $(DP)_{ij}$, C_l é o efeito fixo de horário de coleta, $(DP)_{ij}$ é a interação entre D_i e P_j , $(DC)_{il}$ é a interação entre D_i e C_l , $(PC)_{jl}$ é a interação entre P_j e C_l , $(DPC)_{ijl}$ é a interação entre D_i , P_j , C_l , e e_{ijk} é o efeito aleatório de erro residual $e_{ik} \sim N(0, R)$, onde R é estrutura de correlação de e_{jk} . As estruturas de correlação avaliadas são as mesmas utilizadas para a Eq 1.

As médias foram comparadas por meio de comparações múltiplas utilizando ajuste de multiplicidade de Tukey, disponível na função `emmeans` do pacote `emmeans` (Lenth, 2019) do software R (R Core Team, 2020). Para os efeitos de períodos experimentais e horários de coletas as médias foram ainda comparadas utilizando contrastes por meio de polinômios ortogonais, disponível nas funções `emmeans` e `contrast` do pacote `emmeans` (Lenth, 2019) do software R (R Core Team, 2020). P-valor menor do que 0,05 foi considerado como significativo.

3. RESULTADOS

Foram avaliados os seguintes parâmetros: peso corporal ao longo do experimento, indicadores de estresse (cortisol e glicose no plasma) e indicadores de imunidade (atividade respiratória de leucócitos, atividade do sistema complemento – via alternativa e concentração sérica de lisozima), em peixes alimentados com ração suplementada com β -glucano, logo após a alimentação e 15 dias após sua suspensão, e inoculados com LPS.

Não houve mortalidade durante o período experimental.

3.1. PESO CORPORAL

O peso dos animais apresentou um comportamento quadrático ($p=0,0020$), quando comparamos o período experimental 1, 15 e 30 dias (Figura 2). Não observamos diferença estatística entre o grupo controle e o grupo alimentado com β -glucana ($134\pm 6,64$ g e $127\pm 6,64$ g, respectivamente).

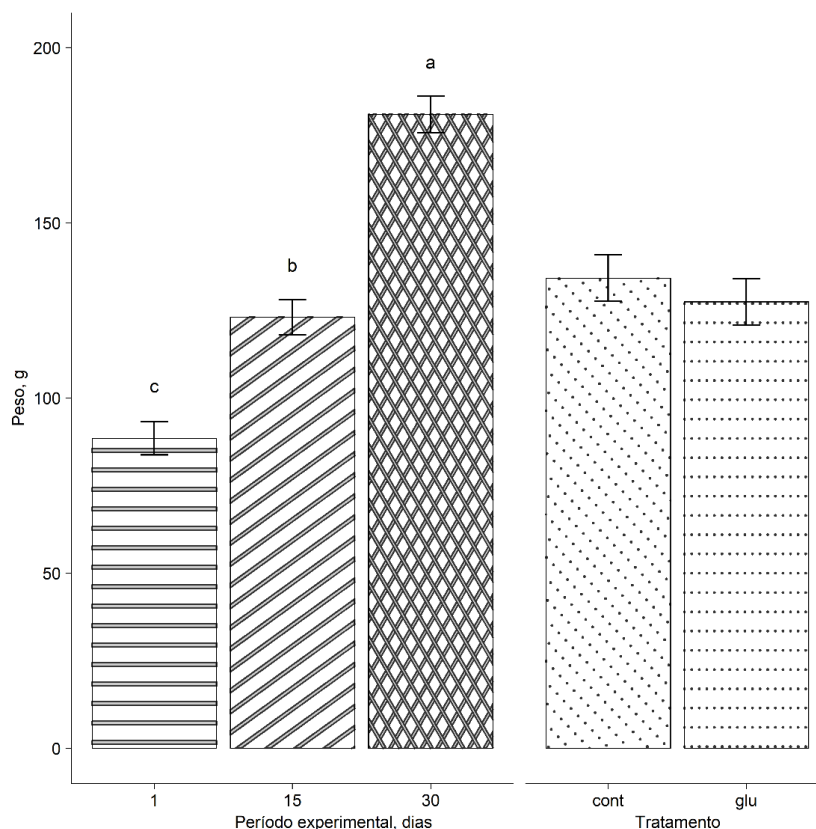


Figura 2. Peso aos dias 1, 15 e 30 do experimento em pacus alimentados com ração controle e suplementada com 0,1 % β -glucana. Letras minúsculas indicam diferença entre os dias de coleta, independente do tratamento. Teste de Tukey ($p<0,05$).

3.2. INDICADORES DE ESTRESSE

3.2.1. Concentração plasmática de cortisol

A concentração plasmática de cortisol foi numericamente maior aos 15 dias se comparado aos 30 dias (15 dias – $310\pm 15,8$ ng ml⁻¹ e 30 dias – $192\pm 15,8$ ng ml⁻¹) (Figura 3), sem diferença estatística. Quando comparamos os tempos de coleta, do mesmo modo, após inoculação do LPS, observamos maior concentração às 3 h ($290\pm 25,8$ ng ml⁻¹) e diminuição às 6h ($247\pm 25,8$ ng ml⁻¹) e

24h ($217 \pm 25,8 \text{ ng mL}^{-1}$), mas sem diferença estatística.

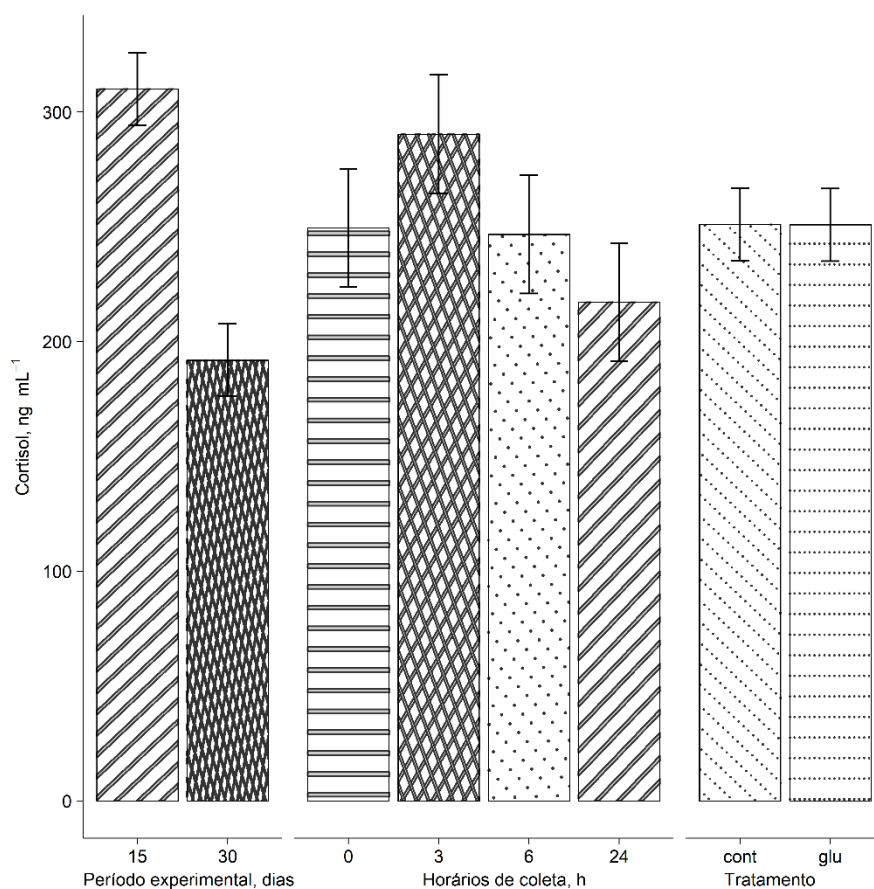


Figura 3. Concentração plasmática de cortisol de pacus alimentados com ração controle ou com 0,1% de β -glucana, aos 15 e 30 dias, nas diferentes amostragens, após inoculação do LPS: 3, 6 e 24h. Ausência de letras indica que não houve diferenças pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.2. Concentração plasmática da glicose

Aos 15 dias, a concentração plasmática da glicose teve um comportamento cúbico ($p = 0,0001$), com pico às 3h e diminuição às 6h e 24h, enquanto, aos 30 dias, o comportamento foi quadrático ($p = 0,0001$), sendo que a partir das 3h os níveis foram subindo (Figura 4). Tanto aos 15 quanto aos 30 dias, a concentração de glicose se eleva 3 h após a inoculação de LPS, sem recuperar o valor inicial (0h) até 24h depois. Comparando os tempos de coleta (0, 3, 6 e 24h) entre os períodos experimentais (15 e 30 dias), observamos diferença às 3h ($p = 0,0018$), quando os níveis de glicose são mais elevados aos 15 dias. Não houve diferença entre peixes alimentados com ração controle e ração suplementada com β -glucana ($72,2 \pm 2,13 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ e $74,1 \pm 2,13 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$).

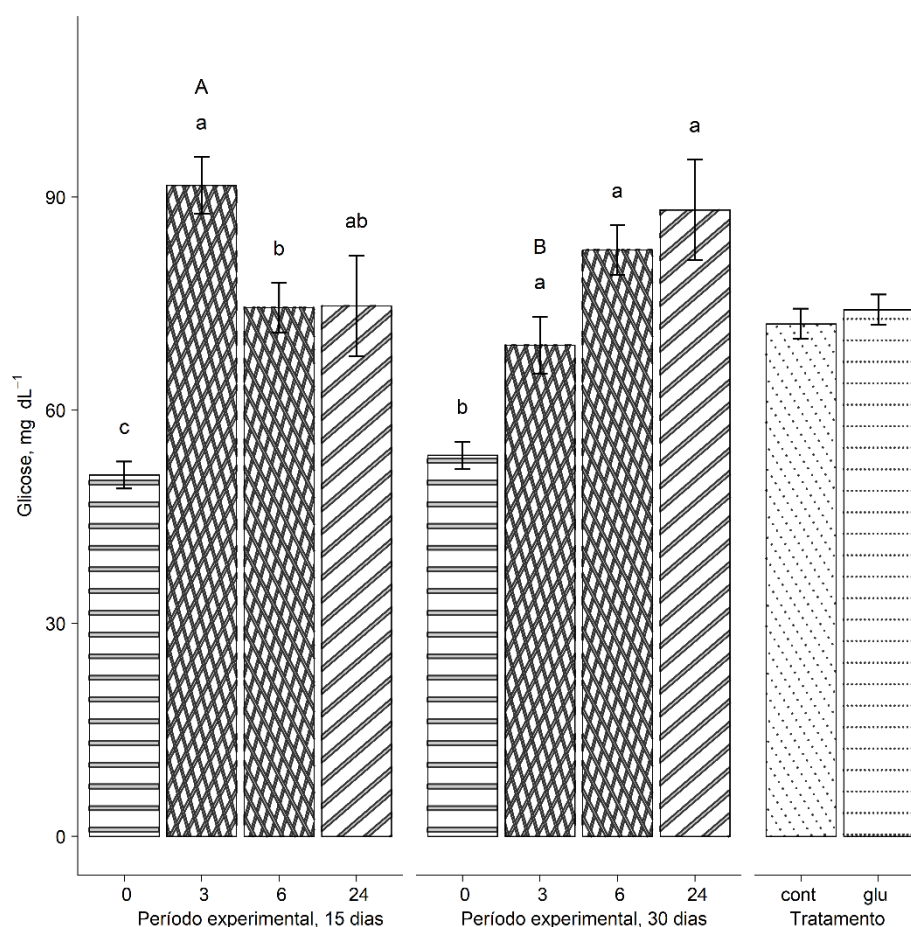


Figura 4. Concentração plasmática da glicose em pacus alimentados com ração controle ou com 0,1% de β -glucana, e inoculados com LPS aos 15 e 30 dias de experimento. Letras maiúsculas indicam diferença entre os períodos experimentais (15 e 30 dias) para o mesmo tempo de coleta e letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de coleta (0, 3, 6 e 24h) para o mesmo período experimental. Ausência de letras indica que não houve diferenças pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3. INDICADORES DE IMUNIDADE INATA

3.3.1. Atividade respiratória dos leucócitos (ARL)

A ARL foi mais elevada aos 30 dias em relação ao observado aos 15 dias, independente do tratamento e manteve-se com valores semelhantes aos iniciais em todos os horários de coleta em ambos os tratamentos (Figura 5). Também não diferiu entre os tratamentos com as dietas suplementadas com β -glucana e a controle.

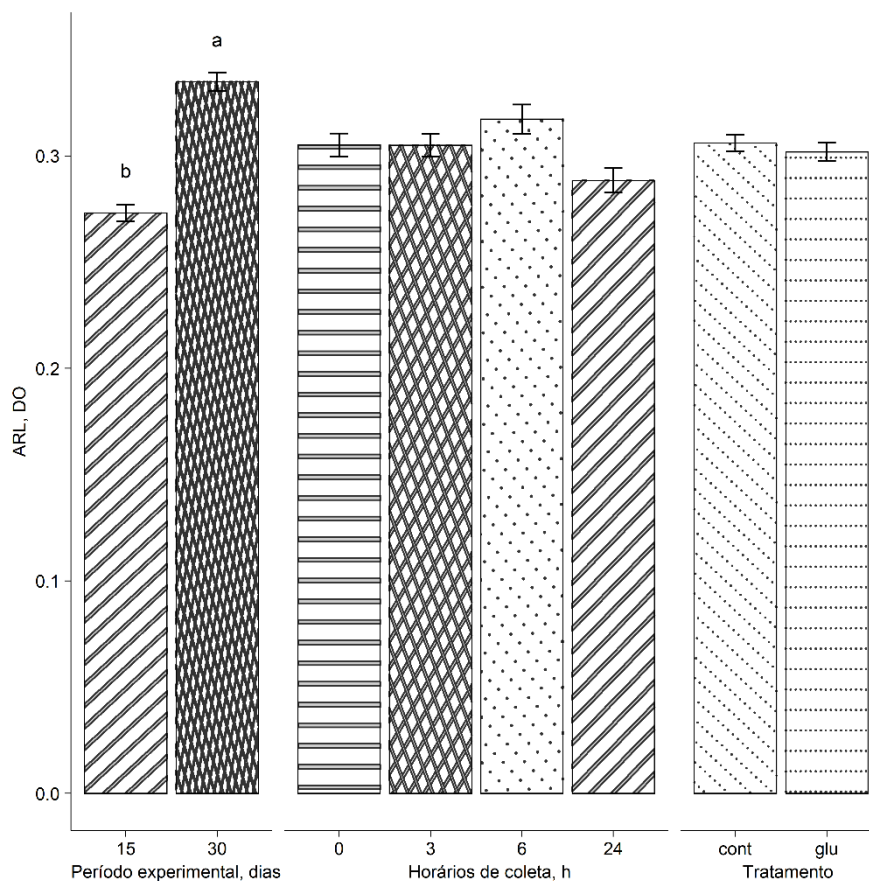


Figura 5. Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) de pacus alimentados com ração controle ou com adição de 0,1% de β -glucana, e inoculados com LPS aos 15 e 30 dias de experimento e amostrados 3, 6 e 24h depois. Letras minúsculas indicam diferença entre os dias 15 e 30 dias, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3.2. Atividade hemolítica do Sistema Complemento (HA-AP)

Não observamos diferença estatística na atividade do sistema complemento entre os períodos experimentais 15 e 30 dias, entre os tempos de coleta e entre os tratamentos com as dietas suplementadas com β -glucana e a controle (Figura 6).

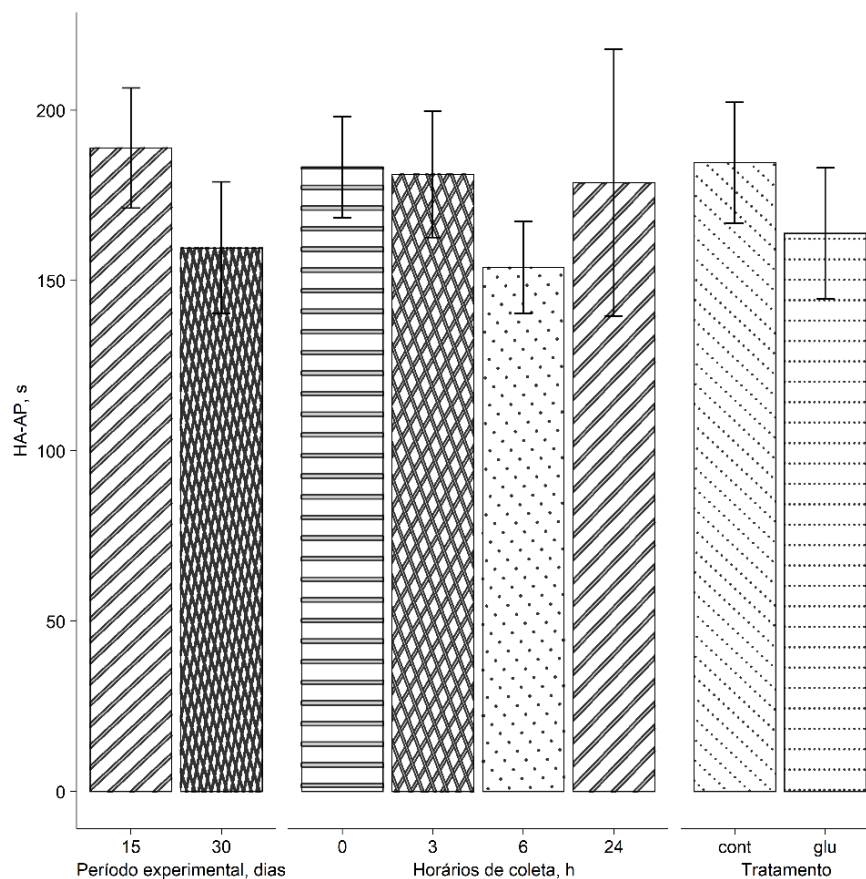


Figura 6. Atividade hemolítica do sistema complemento (HA-AP) de pacus alimentados com ração controle ou com adição de 0,1% de β -glucana e inoculados com LPS aos 15 e 30 dias de experimento e amostrados 3, 6 e 24h depois ($p < 0,05$).

3.3.3. Concentração sérica da lisozima

A concentração sérica da lisozima não apresentou diferença estatística entre 15 e 30 dias, entre os horários de coleta e entre os tratamentos com as dietas suplementadas com β -glucana e a controle (Figura 7).

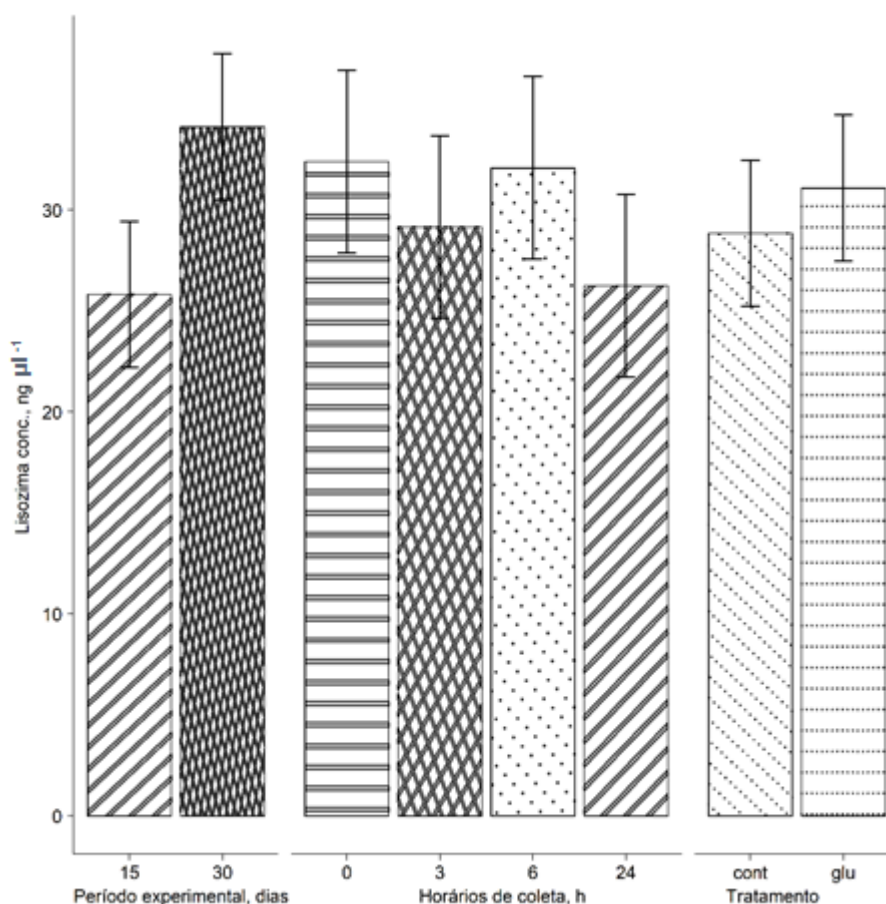


Figura 7. Concentração sérica da lisozima de pacus alimentados com ração controle ou com adição de 0,1% de β -glucana e inoculados com LPS aos 15 e 30 dias de experimento e amostrados 3, 6 e 24h depois ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

O intuito deste estudo foi avaliar a duração do efeito imunoestimulante da β -glucana em juvenis de pacu, logo após a ração suplementada ser ofertada por 15 dias, e 15 dias após sua suspensão. A inoculação com o lipopolissacarídeo LPS foi o desafio ao sistema imune, para evidenciar suas respostas, porém não observamos efeito do produto nos indicadores que testamos. Uma possível explicação para a ausência de respostas foi a concentração do LPS utilizada ($500\mu\text{g kg}^{-1}$). A mesma concentração foi eficiente para tilápia (Ha et al., 2016), mas em pacu, em condições semelhantes às nossas, foi necessário uma concentração mais elevada para gerar respostas imunes (de Mello, 2020).

O presente estudo mostrou aumento crescente de peso dos peixes ao longo do período experimental (1, 15 e 30 dias), o que era esperado, uma vez que eles receberam alimentação até a saciedade aparente, apesar de não ter sido encontrado diferença no crescimento dos animais que receberam ração

controle e ração contendo β -glucana. Em estudo realizado por Dawood et al. (2020), tilápias alimentadas com ração contendo β -glucana por 60 dias em diferentes densidades, apresentaram maior ganho de peso, demonstrando a importância do imunestimulante. Aramli et al. (2015) também observaram aumento do peso final de *Acipenser persicus* alimentados por seis semanas com β -glucana quando comparado ao grupo controle. É possível, que no caso de nosso estudo, o tempo de oferta da β -glucana aos peixes tenha sido insuficiente para promover diferenças no crescimento.

Em relação ao desafio do sistema imune com LPS, cujas respostas foram avaliadas durante 24h após a inoculação, só observamos diferenças no perfil da glicose circulante, aos 15 e 30 dias. As alterações são típicas de resposta de estresse, com elevação dos níveis da glicose a partir de 3h depois da inoculação. No caso do outro indicador de estresse, o perfil do cortisol também foi de elevação às 3 horas, no desafio com LPS, embora a significância estatística tenha sido prejudicada pela alta variação individual dos dados. Um aspecto a destacar são os valores muito elevados, de modo geral, deste indicador. Este dado é de difícil explicação visto que os peixes estavam estocados em condições de boa densidade e com condições ambientais que atendiam as exigências da espécie. O cortisol e a glicose são importantes indicadores fisiológicos de estresse em peixes e preparam os animais para possíveis desafios (Sopinka et al., 2016). Os dados, de forma geral, sugerem que o perfil observado nos dois indicadores estão associados à aplicação do LPS, uma resposta ao manejo da inoculação, resposta do organismo após ser ameaçado por algum estressor. Esse padrão de resposta tem sido descrito em estudos com protocolos experimentais parecidos com o do nosso estudo (Soares et al., 2018; Montoya et al., 2018).

Em relação aos indicadores da imunidade inata, não observamos alteração da atividade respiratória dos leucócitos, do sistema complemento e da concentração sérica da lisozima. A atividade respiratória dos leucócitos é considerada um importante indicador de imunidade inata, pois desempenha o papel de controle das respostas imunológicas e no combate aos patógenos (Babior et al., 1973), mas, neste trabalho, observamos maior atividade apenas aos 30 dias, quando comparado aos 15 dias, independente do tratamento dietético. Este aumento não está associado à β -glucana, o que torna difícil a

explicação desta alteração, já que os peixes dos diferentes tratamentos encontravam-se em condições muito semelhantes.

O sistema complemento, outro importante indicador de competência imunológica, considerado essencial por desempenhar um papel de alerta e identificação de patógenos, além de ataque e apresentação de antígenos (Boshra et al., 2006), não apresentou alterações durante o experimento, quer seja por ação da β -glucana, ou pelo desafio com LPS. Segundo Sabioni et al. (2019), pacus alimentados com 0,5% de β -glucana, por 10 dias e submetidos a captura e inoculação de *Aeromonas hydrophila* não mostraram alteração na resposta do sistema complemento, embora de Mello et al. (2019) tenham relatado potencialização do sistema complemento 24 horas após transporte e inoculação em pacus alimentados com β -glucana. Comparando os estudos, observamos diferenças nos protocolos experimentais que prejudicam uma análise comparativa. Da mesma forma, como na atividade respiratória dos leucócitos e sistema complemento, a lisozima, importante componente da imunidade inata por suas propriedades bactericidas em peixes (Yildiz, 2006; Saurabh & Sahoo, 2008), não foi afetada pelas condições do presente estudo. Da mesma forma, nos estudos supracitados (de Mello et al., 2019; Sabioni et al., 2019), o tratamento com β -glucana não afetou a concentração sérica de lisozima.

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados observados, a β -glucana, após 15 dias de oferta e adicionais 15 dias sem o produto, não afetou o peso dos peixes, e, após inoculação dos animais com LPS ($500\mu\text{g kg}^{-1}$) não houve efeito do tratamento com o produto nos indicadores de estresse e da imunidade inata. A ausência de resposta pode estar associada a concentração inadequada e insuficiente do lipossacarídeo.

6. REFERÊNCIAS

ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. **Basic hematology and serology for fish health programs**. Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202, 1995.

ARAMLI, M.S.; KAMANGAR, B.; NAZARI, R. M. **Effects of dietary β -glucan on the growth and innate immune response of juvenile *Persian sturgeon, *Acipenser persicus****. Fish & Shellfish Immunology, v. 47, n. 1, p. 606-610, 2015.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J. T. **Biological defense mechanisms production by leukocytes of superoxide a potential bactericidal agent**. The Journal of Clinical Investigation, v. 52, n. 3, p. 741-744, 1973.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. **Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus***. Brazilian Journal of Biology, v. 73, n. 2, p. 425-429, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, JAQUELINE D.; URBINATI, ELISABETH C. **Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies**. Anais da Academia Brasileira de Ciência, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1484-1506, 2014.

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

DAWOOD, M.A.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M.Á. **Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review**. Reviews in Aquaculture, v. 10, n. 4, p. 950-974, 2018.

DAWOOD, M.A.; METWALLY, A.E.S.; EL-SHARAWY, M.E.; ATTA, A.M.; ELBIALY, Z.I.; ABDEL-LATIF, H.M.; 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, v. 523, p. 735205, 2020.

de MELLO, M.M.M. **Uso de imunoestimulante, resposta de estresse, do sistema imune, do sistema antioxidante e metabólicas em peixes à condições simuladas comuns da criação**. Tese de doutorado – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2020.

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

DEMERS, N.E.; BAYNE, C.J. **The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout**. Developmental & Comparative Immunology, v. 21, n. 4, p. 363-373, 1997.

FERRIANI, V.P.; BARBOSA, J.E.; DE CARVALHO, I.F. **Serum haemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy: age-related changes**. Acta Paediatrica, v. 79, n. 3, p. 322-327, 1990.

HA, N.; GONÇALVES, A. F. N.; SOUSA, L. C.; BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S. **Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation**. Aquaculture International, v. 25, n. 2, p. 755-776, 2017.

KLEIN, J. **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. p.311-334, 1990.

LENTH R. emmeans: **Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means**. 2019.

LIU, B.; LIU, Y.; WANG, X. **The effect of stocking density on growth and seven physiological parameters with assessment of their potential as stress response indicators for the Atlantic salmon (*Salmo salar*)**. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, v. 48, n. 3, p. 177-192, 2015.

MONTOYA, L.N.F.; FAVERO, G.C.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **Distinct β -glucan molecules modulates differently the circulating cortisol levels and innate immune responses in matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. *Fish & shellfish immunology*, v. 83, p. 314-320, 2018.

PETIT, J.; WIEGERTJES, G.F. **Long-lived effects of administering b-glucans: Indications for trained immunity in fish**. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 64, p. 93-102, 2016.

PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D.; TEAM, R. C. **nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-151. Nlme linear nonlinear mix. Eff. Models R package version.** p. 31-151, 2020.

POLHILL, R.B., PRUITT, K.M., JOHNSTON, R.B. **Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. Experimental and Mathematical Analyses.** *Journal of Immunology*, v.121, p.363-370, 1978.

R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2020.

RODRIGUES, M.V.; ZANUZZO, F.S.; KOCH, J.F.A.; DE OLIVEIRA, C.A.F.; SIMA, P.; VETVICKA, V. **Development of fish immunity and the role of β -glucan in immune responses**. *Molecules*, v. 25, n. 22, p. 5378, 2020.

ROMERO, J.; FEIJOÓ, C.G.; NAVARRETE, P. **Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives**. In *Health and Environment in Aquaculture*, v. 159, p.159-198, 2012.

SABIONI, R.E.; ZANUZZO, F.S.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. **β -Glucan enhances respiratory activity of leukocytes suppressed by stress and modulates blood glucose levels in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 46, n. 2, p. 629-640, 2019.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. **Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system**. *Aquaculture Research*, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. **Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila***. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 19, n. 4, p. 293-306, 2005.

SOARES, M.P.; OLIVEIRA, F.C.; CARDOSO, I.L.; URBINATI, E.C.; CAMPOS, C.M.; HISANO, H. **Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila***, *Fish & Shellfish Immunology*, v.73, p.133-140, 2018.

SOPINKA, N.M.; DONALDSON, M.R.; O'CONNOR, C.M.; SUSKI C.D.; COOKE S.J. **Stress indicators in fish**. *Fish Physiology*, v.35, p. 405–462, 2016.

SUGIURA, N. Further analysts of the data by akaike's information criterion and the finite corrections: Further analysts of the data by akaike's. **Communications in Statistics-Theory and Methods**, v. 7, n. 1, p. 13-26, 1978.

TORT, L. **Stress and immune modulation in fish**. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. **South American fish for continental aquaculture**. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018.

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

YILDIZ, H.Y. **Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after exposure to Leteux-Meyer mixture**. *Turkey Journal Animal Science*, v. 30, n. 2, p. 265-269, 2006.

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

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