

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

Flaviane Wanessa Lopes Fernandes
Bióloga

**Efeito do β -glucano associado ao estresse de manejo e
desafio bacteriano, sobre o sistema antioxidante e
estresse oxidativo de Tilápias do Nilo (*Oreochromis
niloticus*).**

Dracena
2023

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

Flaviane Wanessa Lopes Fernandes

Bióloga

Efeito do β -glucano associado ao estresse de manejo e desafio bacteriano, sobre o sistema antioxidante e estresse oxidativo de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

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

Orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Dalbello Biller

Dracena
2023

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

F363e

Fernandes, Flaviane Wanessa Lopes.

Efeito do β -glucano associado ao estresse de manejo e desafio bacteriano, sobre o sistema antioxidante e estresse oxidativo de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Flaviane Wanessa Lopes Fernandes. -- Dracena: [s.n.], 2023.

52 f. : il.

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

Orientador: Jaqueline Dalbello Biller

1. Peixes. 2. Antioxidantes. 3. Desafio. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

Efeito do β -glucano associado ao estresse de manejo e desafio bacteriano, sobre o sistema antioxidante e estresse oxidativo de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

AUTORA: FLAVIANE WANESSA LOPES FERNANDES

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. Associada JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Presencial) Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - FCAT - UNESP - Dracena

Profa. Dra. FLAVIA THOMAZ VERÊCHIA RODRIGUES (Participação Presencial) Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - FCAT - UNESP - Dracena

Profª. Drª CAMINO FIERRO CASTRO (Participação Virtual)
Dpt. of Molecular Biology / University of León, Facultad de C.C. Biológicas y Ambientales

FIERRO CASTRO
MARIA CAMINO -
43525649N

Firmado digitalmente por FIERRO
CASTRO MARIA CAMINO -
43525649N
Fecha: 2023.03.01 13:33:35 +01'00'

Dracena, 01 de março de 2202

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Flaviane Wanessa Lopes Fernandes, nascida em Tupi Paulista - SP, no dia 31 de agosto de 1986, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela – UNIFADRA - Dracena (SP) em janeiro de 2011, obtendo o grau de licenciatura em dezembro de 2013. Em março de 2021, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, mestrado em Interunidades, campus de Dracena e Ilha Solteira sob orientação da Prof.a Dra. Jaqueline Dalbello Biller.

DEDICATÓRIA

A meus Pais e Avós pela educação compartilhada e o amor constante, pela motivação e a fé, sempre me motivando e guiando a caminhada para o novo, me possibilitando a alcançar novas conquistas e novos métodos de aprendizagem tanto profissional como pessoal.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus pela dádiva da vida, pela motivação da fé continua.

Ao meu Esposo Marcos Rogério pelo apoio e paciência nos dias que não foram fáceis, e sempre que preciso estava presente, que teve que lidar com a minha ausência em diversos momentos, para que este projeto pudesse ser realizado.

A minha família pelo suporte, em especial a minha Irmãzinha Lauriele e minha sobrinha Isabella que nestes dois anos foram parceiras e mesmo não entendendo nada sobre o assunto sempre estavam presentes e ajudando no que fosse preciso, meu eterno agradecimento.

A Basia por estar presente em todo processo de aprendizagem me guiando e orientando, sempre dando o seu melhor, dedicação plena, o coração do grupo, minha admiração e respeito.

A minha orientadora, a Prof.a Dra. Jaqueline Dalbello Biller, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pela paciência e atenção durante este trabalho.

Ao Grupo Lia (Laboratório de imunologia Animal) pela dedicação e parceria.

A Prof.a Dra. Flávia Thomaz pela parceria no desenvolvimento do projeto.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2012/22016-3 pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta dissertação.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.
O saber se aprende com mestres e livros.
A Sabedoria, com o corriqueiro, com a vida e com os humildes.
O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada.
Caminhando e semeando, sempre se terá o que colher.”

(Cora Coralina, 1985)

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Dracena



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

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651 - Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil
Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br

RESUMO

O crescimento da piscicultura brasileira ocasionou o aumento da ocorrência de doenças, decorrentes do estresse causados pela densidade, má qualidade da água, resistência a microrganismos e as consequentes perdas na produção. Entretanto, diversos estudos têm avaliado o uso de imunoestimulantes para prevenção e controle de doenças. Algumas substâncias podem influenciar as respostas do sistema imune de peixes, e nos últimos anos o β -glucano tem sido muito estudado por modular variáveis imunes. Esse composto pode ser utilizado na alimentação de peixes e aumenta a resistência contra enfermidades. Há evidências de que a administração do β -glucano pode ativar de forma eficaz, diversos mecanismos de defesa e auxiliar na defesa antioxidante de peixes. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos desse imunoestimulante sobre as respostas antioxidantes de tilápias. Um total de 408 tilápias foram divididas em 8 tratamentos (1. Controle 15 dias, 2. Controle 15 dias desafiado, 3. β -glucano 15 dias, 4. β -glucano 15 dias desafiado, 5. Controle 30 dias, 6. Controle 30 dias desafiado, 7. β -glucano 30 dias, 8. β -glucano 30 dias desafiado). Aos 14 dias, os grupos 2 e 4 foram desafiados com manejos estressantes (estresse e infecção com $1,0 \times 10^8$ UFC de *S. agalactiae*/peixe inativada). Após 24h, aos 15 dias de experimento, peixes dos tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram amostrados para avaliação de variáveis bioquímicas (proteína total, albumina, globulina e índice A:G); foi coletado o fígado para a avaliação da expressão dos genes Hsp70, CAT, SOD, GPX, GR e GST α por PCR RealTime. Aos 29 dias de experimento, peixes dos tratamentos 6 e 8 foram desafiados com manejos estressantes e (4 peixes de cada caixa, n=12), e após 24h, aos 30 dias de experimento, peixes dos tratamentos 5, 6, 7 e 8 foram amostrados, e passaram pela colheita de sangue e fígado para avaliação das análises citadas. Esse experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos, com 4 repetições cada. No presente estudo a administração de β -glucano promoveu a proteção e capacitação desses compostos, entretanto não promoveram alterações na expressão gênica do gene HSP70, indicando assim a ação benéfica de proteção possibilitando a não ativação da proteína indicativa de estresse oxidativo, indicando que o organismo não estava sob efeito deletério do estresse oxidativo, reagindo bem aos agentes estressores de manejo e a inoculação realizadas durante o desafio.

Palavras chaves: Peixes. Antioxidantes. Desafio.

ABSTRACT

The growth of Brazilian fish farming has led to an increase in the occurrence of diseases, resulting from the management stress caused by density, poor water quality, resistance to microorganisms and the consequent losses in production, causing the imbalance of oxidant compounds and the performance of defense systems antioxidant generating oxidative stress. However, several studies have evaluated the use of immunostimulants for disease prevention and control. Some substances can influence the immune system responses of fish, and in recent years β -glucan has been widely studied for modulating immune variables. This compound can be used in fish feed and increases resistance against diseases. There is evidence that the administration of β -glucan can effectively activate several defense mechanisms and help in the antioxidant defense of fish. Thus, the objective of the present work was to evaluate the effects of this immunostimulant on tilapia antioxidant responses. A total of 408 tilapia were divided into 8 treatments (1. Control 15 days, 2. Control 15 days challenged, 3. β -glucan 15 days, 4. β -glucan 15 days challenged, 5. Control 30 days, 6. Control 30 days challenged, 7. β -glucan 30 days, 8. β -glucan 30 days challenged). At 14 days, groups 2 and 4 were challenged with stressful management (stress and infection with 1.0×10^8 CFU of inactivated *S. agalactiae*/fish). After 24 hours, on the 15th day of the experiment, fish from treatments 1, 2, 3 and 4 were sampled for the evaluation of biochemical variables (total protein, albumin, globulin and A:G index); the liver was collected for the evaluation of the expression of the genes HSP70, CAT, SOD, GPX, GR and GST α by RealTime PCR. At 29 days of experiment, fish from treatments 6 and 8 were challenged with stressful handlings and (4 fish from each box, n=12), and after 24h, at 30 days of experiment, fish from treatments 5, 6, 7 and 8 were sampled, and underwent blood and liver collection for evaluation of the aforementioned analyses. This experiment was conducted in a completely randomized design with 8 treatments, with 4 replications each. In the present study, the administration of β -glucan promoted the protection and capacitation of these compounds, however, they did not promote alterations in the gene expression of the HSP70 gene, thus indicating the beneficial action of protection, allowing the non-activation of the protein indicative of oxidative stress, indicating that the organism it was not under the deleterious effect of oxidative stress, reacting well to the stressors of handling and inoculation performed during the challenge.

Keywords: Fish. Antioxidants. Challenge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Diluições do meio de cultura de bactérias para a contagem de células.....	30
Figura 02- Expressão do gene HSP70.....	35
Figura 03- Expressão do gene CAT.....	36
Figura 04- Expressão do gene SOD.....	37
Figura 05 - Expressão do gene GPX.....	38
Figura 06 - Expressão do gene GR.....	39
Figura 07 - Expressão do gene Gsta.....	40
Figura 08 – Variáveis Bioquímicas Proteínas totais.....	41
Figura 09 - Variáveis Bioquímicas Globulina.....	42
Figura 10 - Variáveis Bioquímicas Albumina.....	43

TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre quimioterápicos, vacinas e imunoestimulantes.....	24
Tabela 2 - Formulação da ração da dieta controle e com β -glucano.....	27
Tabela 03 - Sequência de primers específicos.....	32

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(EROs) ou RLs	Espécies reativas de oxigênio
(SOD)	Dismutase do Superóxido
(CAT)	Catalase
(GPx)	Glutathione peroxidase
(GR)	Glutathione reductase
(GSTa)	Glutathione S-transferase
HSp70	Proteína
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões ou RRPs (do inglês Pattern recognition receptors ou PRRs)
C	Controle
CD	Controle desafiado
β	β -glucano
β D	β -glucano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Radicais Livres.....	17
2.2 Estresse Oxidativo.....	18
2.3 Sistema Antioxidante em peixes.....	18
2.4 Estresse em Peixes.....	19
2.5 Sistema imune dos peixes em relação com sistema antioxidante..	20
2.6 β -Glucano.....	22
2.7 <i>Streptococcus agalactiae</i>	24
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Os objetivos específicos são:.....	25
4. MATERIAL E MÉTODO.....	25
4.1 Instalação.....	25
4.2 Animais.....	25
4.3 Dieta.....	26
4.4 Delineamento Experimental.....	27
4.5 Desafio de Estresse e Infecção Experimental <i>S. agalactiae</i> inativada (bacterina).....	29
4.6 Biologia Molecular.....	30
4.8 Variáveis Bioquímicas.....	34
Proteína total, albumina, globulina sérica e índice A:G.....	34
4.9 Análise Estatística.....	34
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Determinação Molecular da Expressão de Genes por qPCR-RT.....	34
a) Expressão do gene HSP70.....	34
b) Expressão do gene CAT.....	35
c) Expressão do gene SOD.....	36
d) Expressão do gene GPx.....	37
e) Expressão do gene GR.....	38

f) Expressão do gene GSTa.....	39
5.2 Determinação das variáveis bioquímicas.....	40
a) Proteínas totais.....	40
b) Globulina.....	41
c) Albumina.....	42
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
8. REFERÊNCIA.....	47

1 INTRODUÇÃO

Na aquicultura a tilápia está entre as espécies mais promissoras, em evidência as do gênero *Oreochromis*, são algumas das mais promissoras (STICKNEY, 2000) tendo origem no continente africano e Oriente Médio; as tilápias são a espécie de peixe mais cultivados no mundo e no Brasil (LOVSHIN; CYRINO, 1998), com exceção das carpas (ALCESTE; JORRY, 1998).

Os animais aquáticos do gênero *Oreochromis*, em especial *Oreochromis niloticus*, são importantes para as condições de cultivo brasileiras, tendo como vantagem à sua rápida taxa de crescimento, a facilidade de se adaptar aos diversos sistemas de cultivo como produção em tanques-redes, e à alta aceitação pelo mercado consumidor (MEURER *et al.*, 2000; BOSCOLO *et al.*, 2001) entretanto a alta intensidade promoveu o aparecimento de diversas enfermidades, bem como o uso inadequado de quimioterápicos e antimicrobianos, fato que gera muita preocupação por seu impacto negativo no ambiente e nos peixes, como acúmulo de resíduos, desenvolvimento de resistência bacteriana, imunossupressão, estresse de manejo, expondo o peixe a uma série de procedimento traumático como captura, confinamento, manuseio, adensamento e o transporte propriamente dito, que resultam em alterações hormonais, metabólicas, iônicas e hematológicas (ACERETE *et al.*, 2004; BRANDÃO *et al.*, 2006) gerando assim prejuízos na comercialização. Frente ao exposto, durante a última década, muitos estudos foram realizados para avaliação do uso de imunoestimulantes na prevenção de doenças, uma vez que melhoram o mecanismo de defesa não específico, ativando assim, a proteção precoce contra infecções (SAKAI, 1999).

Para suprimir estas dificuldades apresentadas vários estudos vêm sendo realizados com a avaliação de substâncias com características imunoestimulantes no intuito de minimizar o efeito de agentes estressores e melhorar as condições fisiológica dos peixes, sendo o β -glucano um dos imunoestimulantes mais estudados para fins de aquicultura, o β -glucano é encontrado na parede celular de levedura e fungos, caracterizados como macromoléculas, formadas por blocos de glicose unidos por ligações β (1-3) e β

(1-6), tendo ação imunoestimulante em peixes (SAKAI, 1999; DALMO; BOGWALD, 2008; GOPALAKANNAN; ARUL, 2010). Estudos identificaram ações benéficas na prevenção dos efeitos negativos do estresse em peixes, observando a importância do seu ofício como medida profilática (ANDERSON, 1993; SELVARAJ *et al.*, 2005).

O presente estudo tem como objetivo avaliar as ações do imunoestimulante β -glucano associado ao estresse de manejo, sobre o sistema antioxidante e estresse oxidativo de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radicais Livres

O termo radical livre refere-se a o átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (FERREIRA; MATSUBARA, 1992). E este não emparelhamento de elétrons da última camada confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Halliwell e Gutteridge (1989) definem os radicais livres como: qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo.

Os radicais livres (RLs) podem causar danos oxidativos em macromoléculas induzindo a: peroxidação lipídica; oxidação da cadeia lateral de aminoácidos (especialmente cisteína); formando ligações cruzadas entre proteínas e fragmentação proteica pela oxidação de seu esqueleto peptídico; dano do DNA; e quebra das fitas do DNA. Deste modo, níveis elevados de RLs são citotóxicos e podem ser gerados em doenças ou devido ao estresse ambiental (térmico, osmótico, radiação, etc.) (LI; KARIN, 1999; BARBOSA, 2001). Dentre os radicais livres, o OH (*Radical hidroxila*) e o Oxigênio singlet (1O_2) são os que têm maior importância biológica porque são formados durante o processo normal de redução de O_2 no interior das mitocôndrias (BENZI, 1993). Além disso, muitos xenobióticos podem aumentar esta geração de O_2 , e gerar também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pela ausência de elétrons

desemparelhados na última camada não é considerado como um radical livre, mas tem ação de participação na reação que produz o OH (Radical hidroxila). Portanto o H_2O_2 pode ser altamente toxico para as células por ser capaz de atravessar camadas lipídicas, e reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++5} , quando em contato com o Fe aumenta a sua toxicidade gerando hemocromatose transfusional (SORG, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006).

Os RLs possuem uma média de vida curta devido à instabilidade eletrônica que apresentam. Entretanto há grande possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com as quais venham a colidir, promovendo formação de outros radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

a. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é classificado como um desequilíbrio entre níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou RLs e seus antioxidantes. As EROs são produzidas naturalmente em diversos processos biológicos, e em condições normais as células podem apresentar a capacidade de equilibrar a produção de EROs e antioxidantes, porém por alguma disfunção biológica estes compostos podem proporcionar elevados índices e danificar os lipídios, proteínas e DNA. O estresse oxidativo tem sido relacionado a uma grande variedade de doenças, no entanto, as moléculas de EROs também atuam na defesa imune, bem como moléculas de sinalização e na manutenção de processos fisiológicos (WOOD *et al.*, 2003; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

b. Sistema Antioxidante em peixes.

Os efeitos deletérios dos RLs podem ter sua ação inibida por antioxidantes, sendo assim os antioxidantes substâncias que retardam a velocidade da oxidação, protegendo as células de danos oxidativos (BALL *et al.*, 2001). Estas substâncias têm ação direta na neutralização dos radicais livres, ou atuam indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade. O sistema de defesa antioxidante da célula pode atuar de forma preventiva,

evitando a formação e/ou a ação de radicais livres, ou recuperando a lesão ocorrida (SIKKA, 1996 e 2004).

O sistema de defesa antioxidante é dividido em sistema enzimático e o sistema não enzimático. São encontrados nas células onde atuam as substâncias antioxidantes podendo ou não atuarem em conjunto. Os antioxidantes enzimáticos são macromoléculas conhecidas como antioxidantes naturais sendo o primeiro sistema a agir. Tais sistemas são compostos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD); peroxirredoxinas, catalase (CAT) e pelo sistema glutathione peroxidase (GPx)/glutathione redutase (GR)/glutathione S-transferase (GSTa) (HAGEDORN *et al.*, 2012). Já os sistema não enzimático são caracterizados como micromoléculas que podem ser de origem endógena ou dietética incluindo vários compostos hidrofílicos e lipofílicos, como vitaminas, minerais (cofatores enzimáticos) e compostos fenólicos; entre estes últimos estão a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), vitamina A (β -caroteno), piruvato, cisteína, glutathione, selênio, zinco, cobre, magnésio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG; ARNÉR, 2001; LUBERDA, 2005).

Baumber (*et al.*, 2000) destaca em suas pesquisas que a adição de antioxidantes ao sêmen aumenta a tolerância espermática ao dano oxidativo após a descongelamento, neutralizando os radicais livres que causam a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides.

Estudos sobre estresse de manejo demonstram a supressão da resposta antioxidante de peixes. Peixes possuem a habilidade de se adaptar a variados tipos de estressores, internos e externos, aos quais é submetido e são tolerantes ao baixo oxigênio dissolvido. Entretanto, estressores crônicos promovem adaptações e mudanças nesses sistemas. Por exemplo, tilápia desafiadas com manejos estressantes aumentaram a produção de componentes do sistema antioxidante para proteger as células da falta de oxigenação e estressores, entretanto levou ao aumento do metabolismo aeróbico com formação de radicais livres. Estímulos que elevam a produção de radicais livres e/ou à depleção de antioxidantes, promovendo o estresse oxidativo (DROGE *et al.*, 2002).

c. Estresse em Peixes

O ecossistema aquático é extremamente versátil e os animais que vivem nesse ambiente enfrentam adaptações que dificilmente são enfrentadas pelos animais terrestres, tais como mudanças rápidas e extremas de pH, mudanças na concentração de O₂ dissolvidos e salinidade. Essas mudanças podem ocasionar respostas de estresse e alteração no sistema imune. Os agentes estressores podem ser de natureza química; como por exemplo, redução da concentração de O₂ dissolvidos, poluentes orgânicos e inorgânicos (MARIANO; OBA, 2006, 2009). Ou natureza física, como alta densidade populacional, confinamento, captura ou mudanças no ambiente físico (MARIANO *et. al.*, 2009).

d. Sistema imune dos peixes em relação com sistema antioxidante

O sistema imune atua na defesa na proteção do organismo contra microrganismos, toxinas ou células malignas. Sua forma de atuação pode ser dividida em inato ou não específico e específico ou adquirido, que atuam conjuntamente para destruir invasores e para gerar processos de memória imunológica (BAYNE; GERWICK, 2001; SOUZA *et al.*, 2019).

O sistema imune inato tem como função direcionar defesa contra microrganismos e moléculas estranhas de forma inespecífica, diferente do sistema imune adquirido que ataca antígenos de forma específica, presente em microrganismos, produzindo linfócitos T e anticorpos (BILLER; TAKAHASHI *et al.*, 2014).

Ellis (2001) conclui que quando o organismo produz uma resposta contra agentes infecciosos virais, fúngicos, parasitários ou bacterianos, as chances desse agente invadir e se instalar nesse organismo são muito menores.

A primeira linha de defesa contra patógenos no sistema inato, conta com uma barreira física constituída pela pele e o muco. A pele e o muco apresentam uma barreira química, pois contém citocinas, glicoproteínas, lisozima,

imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento e enzimas antimicrobianas com ações inibitórias de patógenos (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

O sistema inato inclui a barreira física da pele e do muco; assim como os componentes celular e humoral (ABREU, 2007; SOUZA *et al.*, 2019). A função do sistema inato é de reconhecer porções que são denominadas PAMPS (*Pathogen associated molecular patterns*) originadas de agente infecciosos ou microrganismos como peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, DNA bacteriano ou RNA viral (ELDWARD; GASQUE, 2003).

O reconhecimento desses componentes não próprios do organismo é realizado por receptores denominados PRRs (*Parttern recognition receptores*), sendo considerados moléculas chaves para emitir alerta do sistema imune frente a invasores (RAUTA *et al.*, 2014). Ao ser reconhecidos pelos receptores RRS e PAMPS é gerado uma cascata de sinalização intracelular, estimulando assim a liberação de diversas citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas IL-1 β , 12, 8, 6 e interferons (IFN) (RAUTA *et al.*, 2014).

Os peixes possuem o sistema inato considerado mais efetivo quando comparado com outros vertebrados, por possuírem uma grande diversidade de genes que codificam os PRRs, devido ao fato de existir inúmeras células procarióticas e vírus no ambiente aquático, tendo como promoção uma grande adaptação dos peixes (MAGNADOTTIR, 2006).

O sistema específico encontra-se em todos os vertebrados, com exceção dos peixes da classe Agnatha (HOLLAND; LAMBRIS, 2002). O sistema adquirido é capaz de reconhecer, reagir e distinguir diversas substâncias, incluindo moléculas com muita semelhança, e gerar memória imunológica (ABBAS; LICHMAN, 2004).

Diferentemente do sistema imune inato, o sistema imune específico necessita da presença do antígeno para desencadear reações que resultarão no aumento de anticorpos específicos para tais invasores, promovendo ainda memória imunológica (BERNSTEIN *et al.*, 1998).

Na busca da preservação da vida, o sistema imune inato e específico trabalha de forma conjunta frente a um organismo invasor (IWANA; NAKANISHI, 1997). As células T possuem a função de ativar células de defesas como linfócitos B, linfócitos citotóxicos e macrófagos, através da liberação de ocitocina

no organismo. Depois de ativados, os linfócitos B produzem anticorpos que ligam-se ao microrganismo, iniciando assim a fagocitose, promovendo a neutralização e a opsonização do agente (ROBI *et al.*, 2003). A ativação dessas células demonstra que os sistemas inato e específico atuam simultaneamente ou isoladamente frente à ameaça de um invasor (GOLDSBY *et al.*, 2002).

e. β -Glucano

O β -glucano é o imunoestimulante mais estudado e muitas pesquisas avaliam uma fração insolúvel da parede celular das leveduras. Esses estudos mostram que esse composto apresenta efeitos na saúde de humanos, mas também em roedores, invertebrados e em peixes (NOVAK; VETVICKA, 2008).

O β -glucano é formado de polissacarídeos naturais que são elementos fundamentais da parede celular e que podem servir como armazenamento de energia em bactérias, fungos, leveduras, algas e plantas (WÓJCIK R *et al.*, 2009). São formados por monômeros de D-glicose e na maioria dos casos exibem uma espinha dorsal, com cadeiras laterais de D-glicose que fazem ligações (1,3) – β ou (1,6) – β , que determinam sua efetividade como imunomoduladores, pois facilitam a estimulação dos mecanismos de defesa não específica dos animais (FIGUEIRAS *et al.*, 1998).

De acordo com estudos, os imunoestimulantes podem gerar respostas positivas mesmo quando utilizados isoladamente, aumentando atividades nos mecanismos de defesa não específicos, como potencialização das células fagocíticas ou células citotóxicas (ANDERSON, 1993). Assim, diversos produtos apresentam adição de β -glucano para aumentar a produtividade e a imunidade dos peixes durante o ciclo de produção (WHITTINGTON *et al.*, 2005).

O β -glucano pode ser administrado de diversas formas, tais como, por injeção, suplementado na dieta e até por imersão na água, sendo que os efeitos imunoestimulantes do β -glucano mostraram-se efetivos em diferentes espécies (PETIT; WIEGERTJES, 2016). Ao adentrar no organismo do animal, processam o β -glucano em fragmentos menores que são capazes de ligar-se às células por receptores e induzir a ativação de células imunes inatas, aumenta a

concentração de proteínas líticas, como lisozima e as do sistema complemento, resultando em uma resposta contra um estímulo indesejável (ORTUNO *et al.*, 2002; STIER *et al.*, 2014).

Quando administrado em dietas para animais, o β -glucano é considerado um PAMP (*Pathogen associated molecular patterns*), pois é reconhecido por receptores, fagocitado e processado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (GOODRIDGE *et al.*, 2011).

A fagocitose é um mecanismo essencial para a destruição de patógenos como também para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são fundamentais na destruição de invasores (PETIT; WIEGERTJES, 2016).

O β -glucano se mostrou positivo na redução da concentração de cortisol, o que indica que a suplementação deste produto pode servir como redutor das respostas de estresse (GARCIA, 2008).

A administração dos imunoestimulantes na piscicultura pode ser por via oral, injeção ou imersão, sendo a injeção intraperitoneal a mais eficiente, porém a que mais causa estresse. A mais utilizada é o método via oral que permite que quase todos os peixes sejam tratados sem que haja outros efeitos prejudiciais (SHAKYAM; LABH, 2014).

O uso de imunoestimulantes pode ser a longo prazo, de forma periódica ou a curto prazo, sendo a de curto prazo a mais indicada, pois quando o animal é exposto a longo prazo pode torná-lo tolerante ao composto, podendo até induzir imunossupressão (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Rodrigues *et al.* (2020) avaliou a utilização de quimioterápicos, vacinas e imunoestimulantes em comparação da eficiência espectro e duração (tabela 1), sendo os imunoestimulantes bem avaliados em comparação com os demais tratamentos.

Tabela 1 - Comparação entre quimioterápicos, vacinas e imunoestimulantes

Aspectos	Quimioterápicos	Vacina	Imunoestimulantes
Situação de uso	Terapêutico	Profilático	Terapêutico/Profilático
Eficácia	Excelente	Excelente	Excelente/Boa
Espectro	Médio	Limitado	Largo
Duração	Curta	Longa	Curta

Fonte: Rodrigues et al., 2020 adaptado de SAKAI, 1999.

2.7 *Streptococcus agalactiae*

A tilápia do Nilo é a espécie mais produzida entre os peixes cultivados. Usualmente é utilizado no sistema de cultivo intensivo, caracterizado por alta taxa de estocagem de peixe e, conseqüentemente, arrazoamento intensivo podendo ocorrer diminuição da qualidade da água e estresse dos animais, tornando-os susceptíveis às enfermidades infecciosas (PLUMB *et al.*, 1997 e 2000).

Segundo Roberts *et al.* (1981; 2008) as principais espécies de bactérias patogênicas para peixes são *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae*.

A bactéria *Streptococcus agalactiae* e o estresse causado pelo manejo e a má qualidade ambiental aumenta a suscetibilidade de tilápia a infecções, inclusive por bactéria (FAGUNDES *et al.*, 2016.) *S. agalactiae* (grupo B, GBS) é um coco Gram positivo e foi o primeiro definido como causa de mastite bovina em 1887.

Lancefield e Hare (1935) posteriormente a identificaram em esfregaços vaginais em 1935, *S. agalactiae* é uma bactéria patogênica essencial frequentemente associada à septicemia e meningoencefalite em peixes (EVANS *et al.* 2008). A doença causa morbidade e mortalidade significativas entre espécies de peixes de água doce, estuarinas e marinhas, incluindo a, tilápia e peixes ciprinídeos (GENG *et al.* 2012; PRIDGEON; KLESIUS 2013; LIU *et al.*, 2014; CHONG *et al.* 2016; DENG *et al.* 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da associação do imunostimulante, estresse de manejo e oxidativo, sobre sistema antioxidante de tilápias.

3.2 Os objetivos específicos são:

- Testar o protocolo atual de imunomodulação preconizado para tilápias;
- Determinar se o β -glucano, que é considerado um PAMP, pode provocar imunossupressão associados com manejos estressantes;
- Avaliar a ação do β -glucano administrado associado a manejos estressantes sobre as variáveis bioquímicas, enzimas antioxidantes e variáveis do estresse oxidativo em tilápias.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Instalação

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 que estavam armazenadas no biotério tampadas com telas impedindo a perda dos peixes.

O sistema de água era aberto com o renovamento de diária e monitorado regularmente; a temperatura era mantida a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Devido as disposições das caixas, foi preciso cobrir a janelas e fazer a instalação de luminárias para que todas as caixas tivessem acesso às 12h no período diurno e noturno.

4.2 Animais

Foram utilizadas 408 tilápias juvenis (*Oreochromis niloticus*), 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, contendo 17 peixes em cada caixa e alimentados durante 03 semanas com dieta comercial para o período de aclimatação, somente após esse período é que o experimento foi iniciado.

4.3 Dieta

No presente experimento, foram confeccionadas duas dietas: Uma dieta controle (livre de β -glucano) e uma dieta experimental (0,1% de β -glucano) preparadas no Instituto de Pesca de São José do Rio Preto – SP e foram formuladas de acordo com as exigências da espécie.

As dietas foram feitas com alimentos pesados, pré-misturados e moídos em triturador tipo martelo com peneira de 0,8 mm, e incluídos os suplementos minerais. Em seguida, 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 2 - Formulação da ração da dieta controle e com β -glucano

Ração Basal		
Matérias Primas		
Descrição	(%)	(%)
	Controle	Teste- β -Glucano
Farelo de Soja	34,218	34,218
Farinha de vísceras	18,000	18,000
Milho	17,511	17,511
Farelo de Trigo	9,000	9,000
Quirera de arroz	8,000	8,000
Farinha de Carne e ossos	6,686	6,686
Protenose	3,446	3,446
Fosfato bicálcico	0,755	0,755
Óleo de Soja	1,000	1,000
Premix*	0,500	0,500
Antifúngico	0,200	0,200
Sal	0,300	0,300
DL-Metionina	0,168	0,168
Antioxidante	0,050	0,050
Calcário	0,167	
Betaglucano		0,167
Total	100,000	100,000

Fonte: Elaborado pela Profa. Dra. Jaqueline Dalbello Biller.

4.4 Delineamento experimental

A fim de testar o protocolo atual de imunomodulação preconizado para tilápia, e verificar se o β -glucano pode apresentar potencial imunossupressor e sua capacidade de amenizar os efeitos do estresse oxidativo após episódios estressantes de manejo, 480 tilápias foram distribuídas em 24 caixas de polietileno de 100 L, com 18 peixes cada, e divididas em 08 tratamentos, com 03 repetições cada.

- Tratamento 01 (C15). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias e serão amostradas após 15 dias de experimento;
- Tratamento 02 (C15D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias, serão desafiadas aos 14 dias, e serão amostradas após 15 dias de experimento;
- Tratamento 03 (β 15). Tilápias receberam dietas experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 15 dias e serão amostradas após 15 dias de experimento;

- Tratamento 04 (β 15D). Tilápias receberam dietas experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 15 dias, serão desafiadas aos 14 dias, e serão amostradas após 15 dias de experimento;
- Tratamento 05 (C30). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e serão amostradas após 30 dias de experimento;
- Tratamento 06 (C30D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e serão desafiadas aos 29 dias, e serão amostradas após 30 dias de experimento;
- Tratamento 07 (β 30). Tilápias receberam dietas experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 30 dias e serão amostradas após 30 dias de experimento;
- Tratamento 08 (β 30D). Tilápias receberam dietas experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 30 dias e serão desafiadas aos 29 dias, e serão amostradas após 30 dias de experimento.

Aos 14 dias, os grupos 02 e 04 foram desafiados com manejos estressantes (estresse e infecção com $1,0 \times 10^8$ UFC de *S. agalactiae*/peixe inativada). Após 24h, aos 15 dias de experimento, peixes dos tratamentos 01, 02, 03 e 04 foram amostrados, anestesiados em solução de óleo de cravo ($1\text{g } 10\text{ L}^{-1}$ de água), foi coletado sangue de 4 peixes de cada caixa ($n=12$) para avaliação de variáveis bioquímicas (proteína total, albumina, globulina e índice A:G) e cortisol (Kit comercial); coletado o fígado para a avaliação da expressão dos genes Hsp70, CAT, SOD, GPX, GR e GST α por PCR RealTime; e coletado o fígado para avaliação das respostas enzimática antioxidante no fígado (CAT, GPx e SOD).

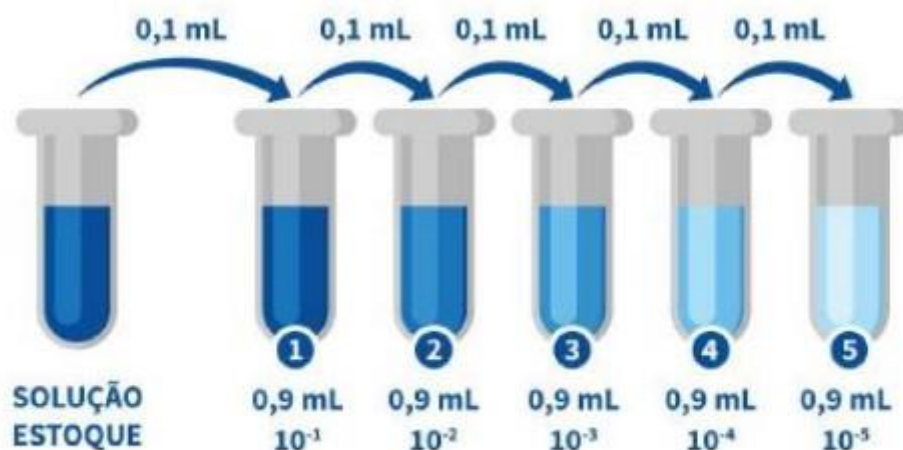
Em seguida, individualmente pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01 g, e medidos em ictiômetro. Aos 29 dias de experimento, peixes dos tratamentos 06 e 08 foram desafiados com manejos estressantes e (04 peixes de cada caixa, $n=12$), e após 24h, aos 30 dias de experimento, peixes dos tratamentos 05, 06, 07 e 08 foram amostrados, e passaram pela colheita de sangue e fígado para avaliação das análises citadas.

4.5 Desafio de estresse e infecção experimental *S. agalactiae* inativada (bacterina)

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. Os tecidos foram incubados por 24-48 h à 28°C e semeados em placas de cultura contendo ágar BHI apropriado para isolar a bactéria é 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 óptica 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 -20o C por 30 minutos antes de armazenar a -80oC. 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 óptica 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 oC 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 01).

Figura 01 - Diluições do meio de cultura de bactérias para a contagem de células.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após a diluição, foram semeadas as diluições entre 10^{-6} a 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 $100\mu\text{L}$ por 10g de peso vivo de suspensão de *S. agalactiae* inativada (aquecimento a 50°C por 30 min) na concentração de $1,3 \times 10^8 \text{ UFC/ mL}^{-1}$ na cavidade pélvica dos peixes dos tratamentos 02 e 04 aos 14 dias de confinamento, e tratamentos 06 e 08 aos 29 dias de confinamento. Diversos estudos apresentam desafios com a bactéria atenuada ou viva, mas apresentam alta mortalidade. Neste caso, foi realizado com a bactéria inativada para avaliar se houve a potencialização da resposta imunológica dos peixes através de uma terceira coleta.

4.6 Biologia molecular

Análise do transcriptoma de citocinas pró-inflamatórias Hsp70, CAT, SOD, GPX, GR e GST α por RT-PCR.

O fígado foi coletado 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 de citocinas Hsp70, CAT, SOD, GPX, GR, GST α por RT-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 será quantificado em equipamento que determina a quantidade de RNA em ng (Nanodrop ou similar). E a partir do RNA extraído, componente que apresenta pouca estabilidade, será obtido o cDNA por transcrição reversa (RT) sintetizado pelo script™.

Em seguida, a sequência será amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers desenhados (selecionados em literatura para a espécie *Oreochromis niloticus*) (Tabela 1), dNTPs e enzima DNA polimerase de Taq em um termociclador, que proporcionará 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 utilizadas serão de acordo com a literatura (Tabela 1), com a finalidade de resultar na síntese de centenas de milhões de cópias do fragmento de DNA amplificado.

A viabilidade dos resultados da amplificação serão analisados a partir da visualização em gel de agarose (0,8%) submetida à eletroforese (numa cuba de eletroforese acoplada à fonte de energia) em tampão TBE 0,5x Tris-Borato (0,045M), EDTA (1 mM), e observados através da transiluminação do gel em luz ultravioleta (equipamento de fotodocumentação), após coloração em solução de GelRed™ (Biotim), (o corante usual composto por brometo de etídeo (0,5 µg/mL) não será utilizado devido suas características cancerígenas, mutagênicas além de ser considerado um contaminante ambiental) e comparados com um padrão de tamanho molecular de DNA aplicado na primeira canaleta do gel onde serão aplicadas as amostras a serem analisadas em corrida eletroforética (SAMBROOK *et al.*, 2001; KUBISTA *et al.*, 2006).

Em seguida a reação de amplificação foi realizada em equipamento de RT-PCR, uma vez que a quantificação dos ácidos nucleicos é mais precisa, pois é realizada na fase exponencial da reação. O limiar da fase exponencial 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”).

Tabela 3 - Sequência de primers específicos

Gene	Sequência Fw/Rv (5'-3')	PB	Ta	Accession N°	Referência
β-actin_B	F: GTGCCCATCTACGAGG GTTA R: CTCTTTGATGTCACGCA CGA	156	95°C	KJ126772	Mahmoud A. O. Dawood et al. 2020
EF-1α_A	F: ATCAAGAAGATCGGCT ACAACCCT R: ATCCCTTGAACCAGCT CATCTTGT	109	95°C	AB075952.1	Dong-Liang Lu et al. (2019)
Hsp70	F: CATCGCCTACGGTCTG GACAA R: TGCCGTCTTCAATGGT CAGGAT	107	95°C	FJ207463.1	J. Qiang et al. 2016
CAT	F: CCCAGCTCTTCATCCA GAAAC	103	95°C	JF801726.1/ XM_003447 521	E, S. dos Reis Goes et al. 2019

	R: GCCTCCGCATTGTACT TCTT				
SOD	F: TCCAGCCTGCCCTCAA GTT R: CCAAAGTCCCGTTTGA TTGC	127	95°C	JF801727	Malachy N.O. et al. 2017
GPX	F: CGCCGAAGGTCTCGTT ATTT R: TCCCTGGACGGACATA CTT	107	95°C	NM_001279 711.1	E, S. dos Reis Goes et al. 2019
GR	F: CATTACCGAGACGCGG AGTT R: CAGTTGGCTCAGGATC ATTTG	420	95°C	XM_003445 184.5	Abd elhakeem I. et al. 2019
GSTα	F: TAATGGGAGAGGGAAG ATGG R: CTCTGCGATGTAATTCA GGA	202	95°C	NM_001279 635.1	Rui Jia et al. 2019

Fonte: Elaborado pela autora.

4.8 Variáveis bioquímicas

Proteína total, albumina, globulina sérica e índice A:G

A concentração de proteína total foi determinada no soro pelo método do Biureto (kit comercial) e a de albumina pelo método colorimétrico – verde de bromocresol (kit comercial).

A globulina foi determinada subtraindo a albumina da proteína total e o índice albumina-globulina (A:G) foi calculado dividindo-se o valor da fração albumina pelo valor total da fração globulina de cada amostra analisada.

4.9 - Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), pelo programa estatístico SAS, versão 9.0.

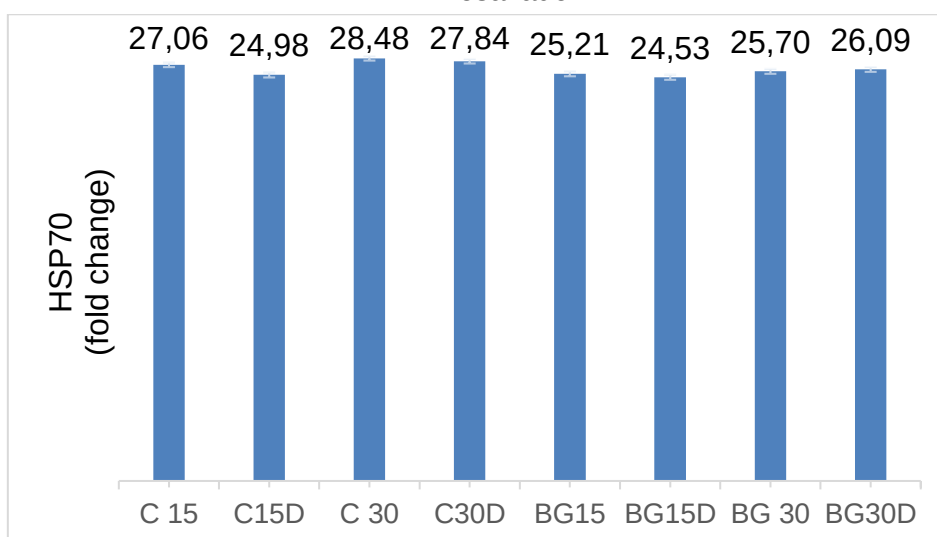
5 RESULTADOS

5.1 Determinação molecular da expressão de genes por qPCR-RT.

a) Expressão do gene HSP70

Não houve diferença na expressão do gene HSP70 entre os tratamentos avaliados (Figura 2).

Figura 2 - Expressão relativa do gene HSP70 em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR. Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β -glucano, D= Desafiado

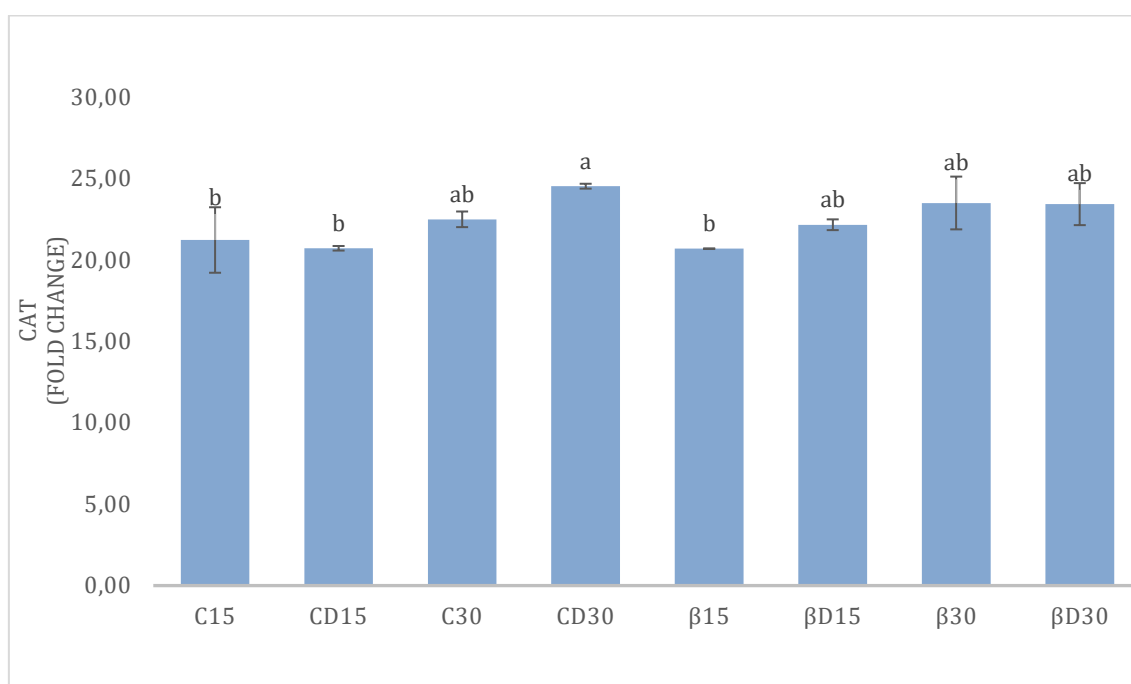


Fonte: Elaborado pela autora.

b) Expressão do gene CAT

A expressão do gene CAT foi maior nos peixes alimentados com dieta controle por 30 dias (C30D) em comparação com os grupos peixes alimentados com dieta controle, controle desafiado e β -glucano por 15 dias (C15, C15D e BG15), entretanto sem diferença estatística em comparação com os demais grupos (Figura 3).

Figura 3 - Expressão relativa do gene Catalase (CAT) em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR. Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β -glucano, D= Desafiado.

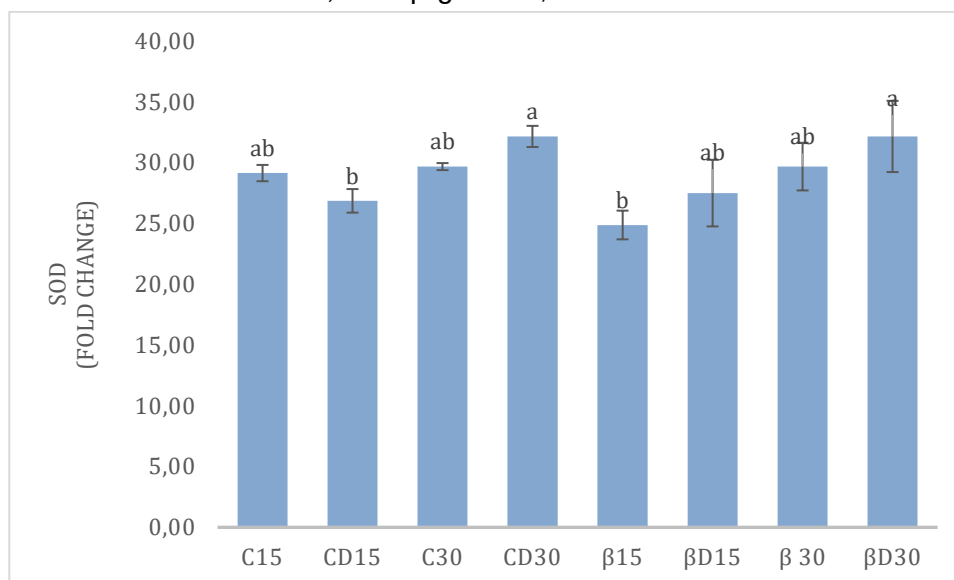


Fonte: Elaborado pela autora.

c) Expressão do gene SOD

A expressão do gene SOD (Dismutase do Superóxido) foi maior nos peixes alimentados com dieta controle e desafiado por 30 dias (C30D e BG30D) em comparação com peixes alimentados com dieta controle e desafiado e β -glucano por 15 dias (C15D e BG15), entretanto sem diferença estatística em comparação com os demais grupos (Figura 4).

Figura 4 - Expressão relativa da enzima superóxido dismutase (SOD) em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR. Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β -glucano, D= Desafiado.

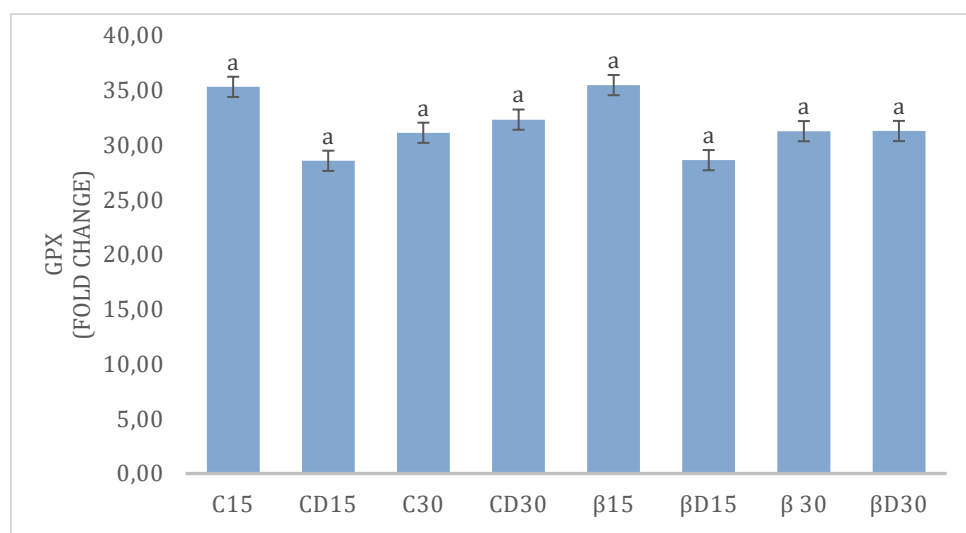


Fonte: Elaborado pela autora.

d) Expressão do gene GPx

A expressão do gene glutathione peroxidase (GPx) não apresentou diferença entre os tratamentos estudados (Figura 5).

Figura 5 - Expressão relativa da GENE sistema glutathione peroxidase (GPx) em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR. Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β -glucano, D= Desafiado.

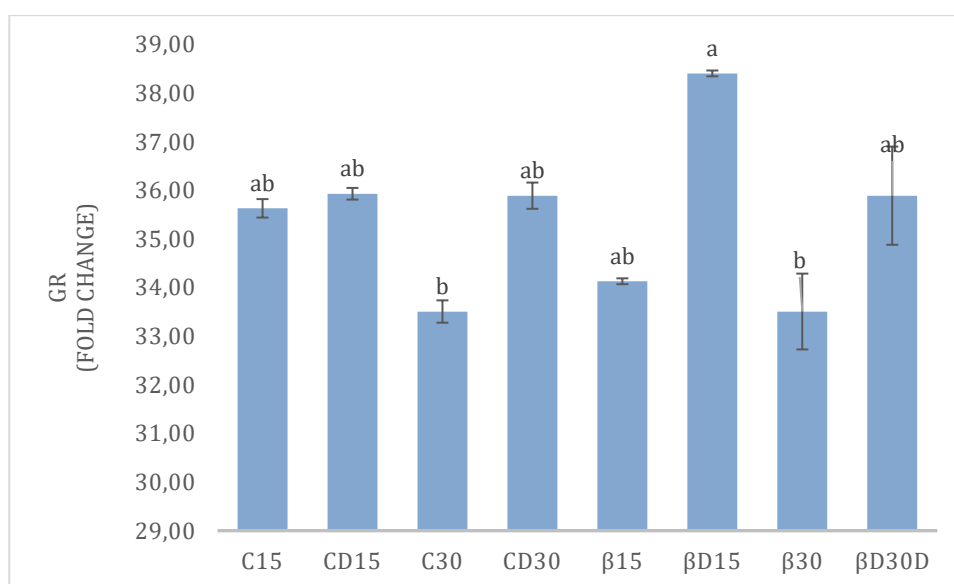


Fonte: Elaborado pela autora.

e) Expressão do gene GR

A expressão do gene glutathiona redutase (GR) foi maior nos peixes alimentados com β -glucano por 15 dias (BG15) em comparação com peixes alimentados com dieta controle e β -glucano por 30 dias (C30 e BG30), entretanto sem diferença estatística em comparação com os demais grupos (Figura 6).

Figura 6 - Expressão relativa do gene glutathiona redutase (GR) em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR. Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β -glucano, D= Desafiado



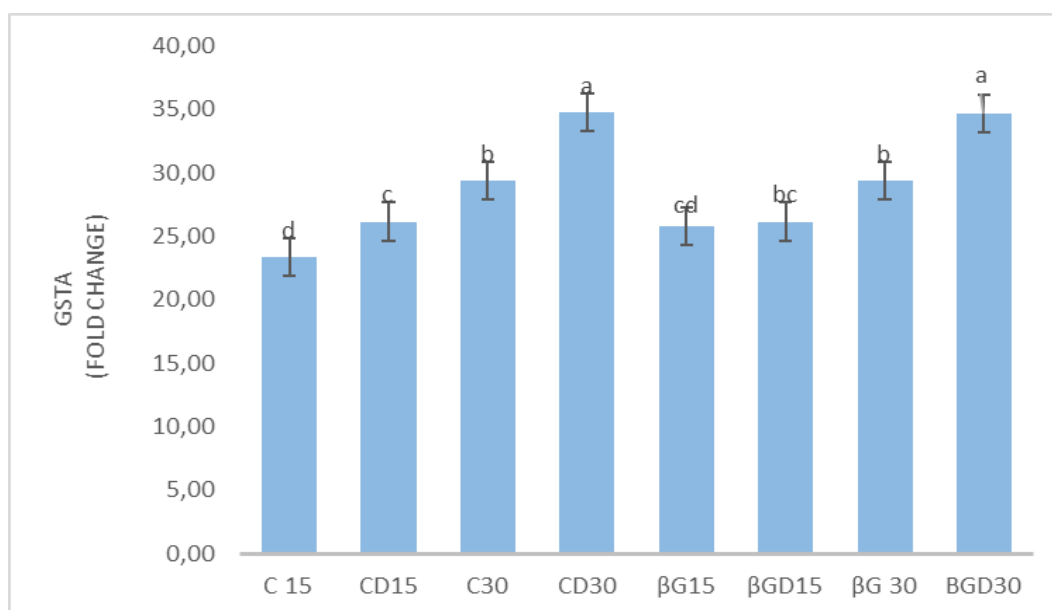
Fonte: Elaborado pela autora.

f) Expressão do gene GSTa

A expressão do gene glutathiona s-transferase (GSTa) foi maior para peixes alimentados com dieta controle por 30 dias e desafiados (C30D) e alimentados com β -glucano por 30 dias (BG30D), em comparação com todos os demais tratamentos. Em seguida, a expressão gênica foi maior nos peixes alimentados com dieta controle e β -glucano por 30 dias (C30, BG30) em comparação com peixes alimentados com dieta controle por 15 dias e desafiados

(C15, C15D) e alimentados com β -glucano por 15 dias (BG15), entretanto sem diferenças com os demais grupos (Figura 7).

Figura 7 - Expressão relativa da GENE glutathiona s-transferase (GSTa) em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR. Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β -glucano, D= Desafiado



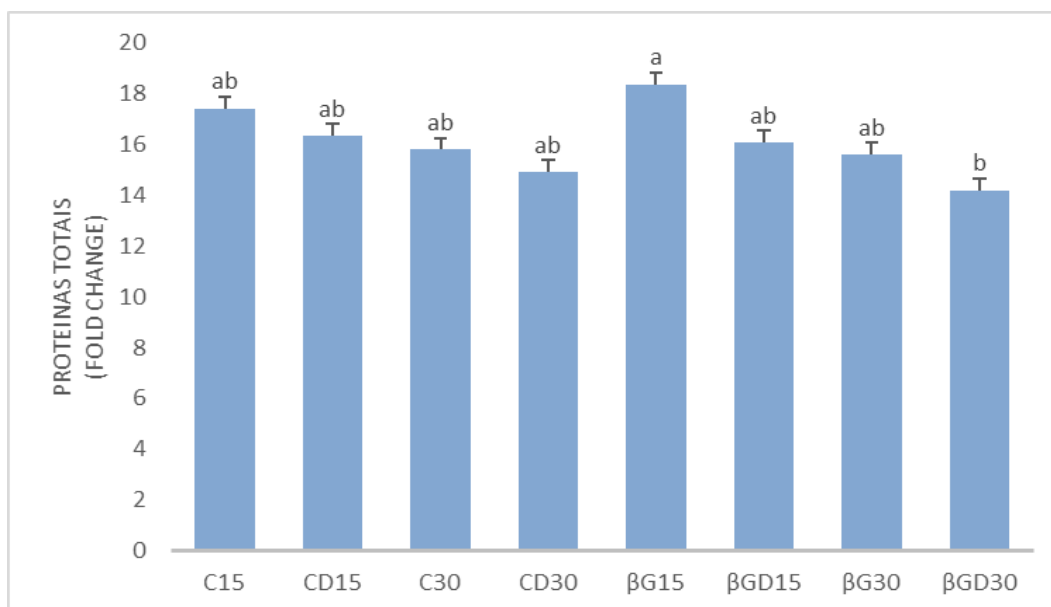
Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Determinação das variáveis bioquímicas.

a) Proteínas totais.

A concentração de proteínas totais foi maior nos peixes alimentados por 15 dias com β -glucano em comparação com peixes alimentados por 30 dias com β -glucano desafiados, entretanto sem diferença estatística em comparação com os demais grupos.

Figura 8 - Expressão relativa dos níveis variáveis de proteínas totais em soro (retirado da amostra de sangue) de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR. Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β -glucano, D= Desafiado

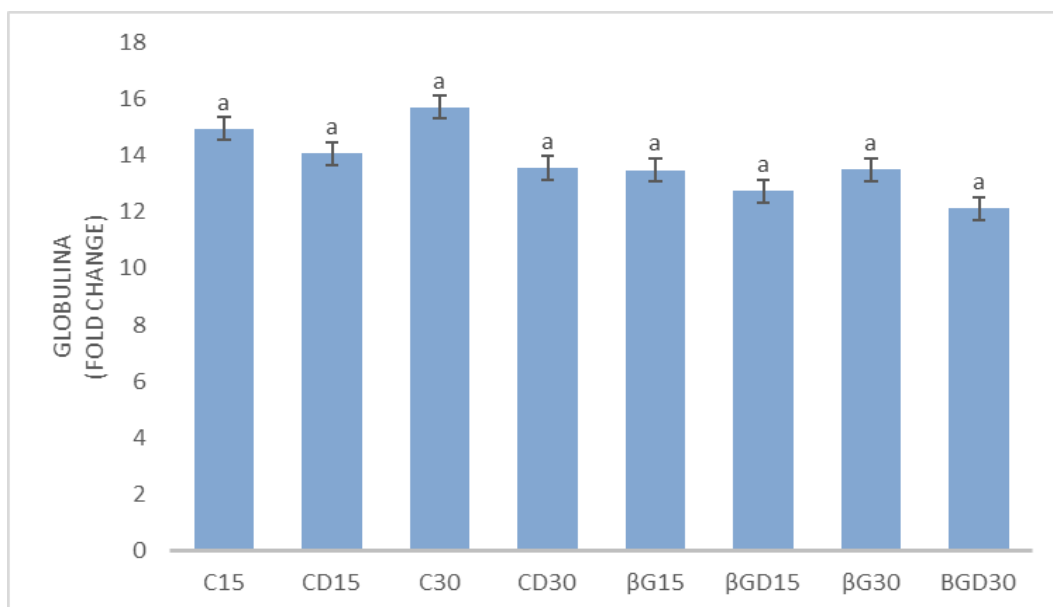


Fonte: Elaborado pela autora.

b) Globulina

A concentração de globulina não apresentou diferença entre os tratamentos estudados (Figura 9).

Figura 9 - Expressão relativa dos níveis variáveis da proteína globulina em soro (retirado da amostra de sangue) de tilápia alimentadas com β-glucano, por RT-PCR. Valores são médias ± desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β-glucano, D= Desafiado.

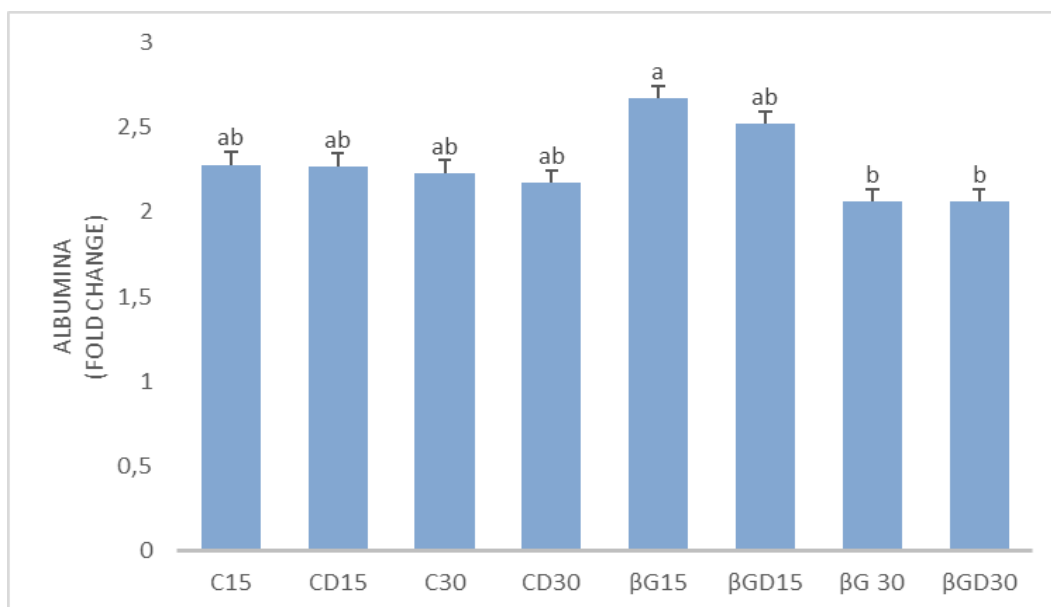


Fonte: Elaborado pela autora.

c) Albumina

A concentração de albumina foi maior nos peixes alimentados por 15 dias com β -glucano (BG15) em comparação com peixes alimentados por 30 dias com β -glucano e desafiados (BG30, BG30D), entretanto sem diferença estatística em comparação com os demais grupos (Figura 10).

Figura 10 - Expressão relativa dos níveis variáveis da proteína albumina em soro (retirado da amostra de sangue) de tilápia alimentadas com β -glucano, por RT-PCR. Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, BG= β -glucano, D= Desafiado.



Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os efeitos do β -glucano sobre o sistema imunológico frente ao estresse de manejo, e foi observado aumento de enzimas hepáticas antioxidantes e séricas em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) avaliadas pelo método RT-PCR e análises bioquímicas.

No presente estudo, foi realizada associação entre o β -glucano e manejos estressantes, e foi observado aumento na expressão de genes do sistema antioxidante, principalmente nos tratamentos que receberam infecção experimental. Indicando que a presença de um processo inflamatório aumenta os radicais livres e por consequência aumenta a produção dos compostos antioxidantes. Durante a fagocitose de patógenos, os leucócitos aumentam o seu consumo de oxigênio intracelular e consequentemente há produção de diversas espécies reativas de oxigênio (EROs) que são radicais livres (BILLER *et al.*, 2013).

O presente estudo não demonstrou alteração significativa na expressão gênica do HSP70 após exposição ao estresse de manejo e aos tratamentos, isso indica que não houve a necessidade da célula ativar os mecanismos de reparo, transporte ou até mesmo proteção de danos às proteínas em resposta aos tratamentos (CONTARDO-JARA *et al.*, 2010). A HSP70 é considerada uma

proteína defensora, que atua como chaperocina, ou seja, é reconhecida por receptores que desencadeiam respostas pró-inflamatórias, frente ao desequilíbrio gerado pelo estresse oxidativo ou infecção. São capazes de desencadear a resposta celular causada pelo estresse em diferentes células e órgãos, alterando a expressão de proteínas específicas relacionadas à proteção do organismo, como as enzimas antioxidantes (ASEA A. 2008). O presente estudo demonstrou que a associação do β -glucano e os manejos de estresse aplicados não promoveram alterações deletérias que resultam no aumento da HSP7, demonstrando a eficácia do tratamento com o β -glucano (SIQUEIRA-BATISTA R; MENDONÇA EG; GOMES AP; VITORINO RR; MIYADAHIRA R; ALVAREZ-PEREZ M, 2012).

A expressão do gene CAT (catalase) foi ativada no fígado resultando aumento na produção de defesas antioxidantes enzimáticas nos peixes desafiados e alimentados com dieta controle por 30 dias, identificando que houve produção do sistema de defesa para combater os radicais livres produzidos pelos agentes estressores de manejo e inoculação durante o desafio. As enzimas antioxidantes são constantemente citadas na literatura como biomarcadores de contaminação em diversos organismos, entretanto a expressão de gene CAT foi menor nos peixes alimentados com β -glucano, principalmente por 15 dias, mostrando um papel protetor desse imunoestimulante. A CAT é essencial para o funcionamento do sistema inato de defesa. A modulação da produção da CAT é importante para muitos processos, tais como proliferação, diferenciação, migração celular e apoptose (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; OOST *et al.*, 2003; MALHOTRA; KAUFMAN, 2007; VEAL *et al.*, 2007; ZAMOCKY *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2013). O uso de β -glucano apesar de modular o sistema de defesa não aumenta a demanda desse antioxidante, indicando que é seguro e eficiente em peixes.

A expressão do gene SOD (Dismutase do Superóxido) estudado no presente estudo foi maior nos peixes desafiados por 30 dias e alimentados com a dieta controle, evidenciando que a produção desta enzima está relacionada com a defesa imunológica contra patógenos, e consequentemente contra a produção de RLs produzidas durante o desafio. Os peixes apresentam uma ampla e complexa capacidade no sistema antioxidante, a SOD é uma substância

enzimática capaz de evitar acúmulo intracelulares de RLs (WINSTON,1991; HALLIWELL *et al.*, 1995; PIETTA, 2000) sendo caracterizada como primeira linha de defesa contra os danos oxidativos (ATLI G; CANLI M, 2010). Assim, houve aumento da SOD para proteção do organismo contra a produção de RLs causadas pela infecção experimental, e que o tempo foi um fator de estresse para o animal, que em comparação ao tratamento efetuado em 15 dias não demonstrou nenhuma alteração significativa ao projeto estudado.

No presente estudo, não houve diferença entre os tratamentos sobre a expressão do gene da glutathione peroxidase (GPx). Cunha Bastos VL (2007) demonstrou em seus estudos que a enzima GPx tem ação moderada no fígado em situações que acionam o estresse oxidativo comparado ao rim e baço, ou seja, mesmo em presença do desafio com agentes estressores o sistema imunológico conseguiu combater os radicais livres não causando alterações significativas desta enzima. Shan X, Aw TY, Jones DP. (1990) observou que as características da enzima glutathione peroxidase (GPx) atua como a linha de defesa com ação detoxificadora agindo contra a ação dos RLs antes que estes causem lesões no organismo, sendo assim, podemos concluir que o estresse de manejo ocasionado nos tratamentos de 15 e 30 dias não estimulou a produção desta enzima não havendo aumento significativo.

No presente estudo, a expressão do gene glutathione reductase (GR) foi maior nos peixes alimentados com β -glucano por 15 dias em comparação com peixes alimentados com dieta controle e β -glucano por 30 dias, não demonstrando diferença estatística em comparação com os demais grupos sendo uma enzima responsável pela regeneração da glutathione oxidada (GSSG) em sua forma reduzida (GSH), utilizando como substrato da enzima GPX, como observado na ação estável da enzima GPX concluindo.

Já a expressão do gene Glutathione-S-transferase (GST) foi maior para peixes alimentados com dieta controle nos peixes desafiados aos 30 dias demonstrando que houve a produção da enzima para defesa contra os RLs e que o β -glucano é capaz de minimizar os danos causados pela ativação dos RLs como ocorreu na dieta com β -glucano por 30 dias. A Glutathione-S-transferase (GST), pertence a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos

xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais.

As variáveis bioquímicas foram avaliadas a fim de verificar a condição física dos peixes. No presente estudo, a concentração de proteínas totais e albumina foi maior nos peixes alimentados por 15 dias com β -glucano, indicando boa condição física com curto período de administração do imunoestimulante. Os níveis de proteínas totais no soro são atribuídos aos diferentes componentes protéicos, como as globulinas, bem como a lisozima, complemento, e outros peptídeos (ALEXANDER; INGRAM 1992; MISRA *et al.*, 2009). Por outro lado, a concentração de globulina não apresentou diferença entre os tratamentos estudados, indicando que esse aumento não está relacionado com proteínas de defesa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que o β -glucano pode ser uma ferramenta com o potencial adjuvante para proteção contra *S. agalactiae* e o estresse oxidativo, podendo promover o controle e prevenção de enfermidades estreptocócicas e da ação dos radicais livres. Houve interação benéfica entre a administração do β -glucano e a vacinação em tilápias. Foi possível verificar a ação do β -glucano sobre a expressão de genes do sistema antioxidante de tilápias; uma vez que mostrou aumento a expressão de genes, CAT, SOD, GR e GST α e sem alterar os genes Hsp70 e Gpx e variáveis bioquímicas proteínas totais, albumina e globulina

8 REFERÊNCIA

ABBAS, A. K.; LICHMAN, A. H. **Basic Immunology**: functions and disorders of the immune system. [S.l.: s.n.], 2004.

ABREU, J. S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com β 1, 3 glicano**: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura. 2007. Tese (Doutorado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

ALCESTE, C.; JORRY, D. E. Análisis de las tendencias actuales en la comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norteamérica y la Unión Europea. **Aquicultura Brasil**, [S.l.], v. 10, n. 1998, p. 349-364, 1998.

ALEXANDER, J. B.; INGRAM, G. A. Noncellular non-specific defense mechanisms of fish. **Annual Revision of Fish Disease**, [S.l.], v. 2, p. 249–279. 1992.

AMPHAN, S. Feeding-regimen of β -glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 87, p. 120-128, 2019.

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual review of fish diseases**, [S.l.], v. 2, p. 281-307, 1992.-

ATLI, G.; CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicol Environ Safe**, v. 73, p. 1884–1889.

BALL, B. A. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BAUMBER, J. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BAYNE, C. J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 725-743, 2001.

BERNSTEIN, R. M. Immunity. In: EVANS, D. H. **The physiology of fishes**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. p. 215-242.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1745-1751, 2013.

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*. **Braz. J. Biol.**, v. 73, p. 425-429, 2013.

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.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, [S.l.], v. 82, p. 47-95, 2002.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, [S.l.], 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**, [S.l.], v. 40, n. 2-4, p. 85-94, 2003.

EVANS, J. J. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. **Journal of medical microbiology**, [S.l.], v. 57, n. 11, p. 1369-1376, 2008.

FAGUNDES, L. C. Transferência passiva de soro hiperimune anti-*Streptococcus agalactiae* e seu efeito profilático em tilápias-do-nilo infectadas experimentalmente: sobrevivência e títulos de anticorpos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 68, p. 379-386, 2016.

FIGUEIRAS, A. Regression models: calculating the confidence interval of effects in the presence of interactions. **Statistics in medicine**, [S.l.], v. 17, n. 18, p. 2099-2105, 1998.

GARCIA, F. **Suplementação alimentar com β -glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2008.

GENG, Y. *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. **Transboundary and emerging diseases**, [S.l.], v. 59, n. 4, p. 369-375, 2012.

GOLDSBY, R. E. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase δ proofreading. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 99, n. 24, p. 15560-15565, 2002.

GOODRIDGE, H. S. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. **Nature**, [S./], v. 472, n. 7344, p. 471-475, 2011.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. **Aquaculture research**, [S./], v. 41, n. 6, p. 884-892, 2010.

HAGEDORN, M. Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. **PloS one**, [S./], v. 7, n. 6, p. e39397, 2012.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The Characterization of Antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, [S./], v. 33, p. 601-612, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. [S./]: Oxford University Press, 1985. p 543.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, [S./], v. 381, p.571-579, 1996.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, [S./], v. 295, p.1852-1858, 2002.

HOAR, W. S. **The fish immune system: organism, pathogen, and environment**. [S./]: Academic press, 1997.

HOLLAND, M. The complement system in teleosts. **Fish & shellfish immunology**, [S./], v. 12, n. 5, p. 399-420, 2002.

JENEY, G.; ANDERSON, D. P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish & Shellfish Immunology**, [S./], v. 3, n. 1, p. 51-58, 1993.

KE, X. Digital gene expression analysis in the liver of ScpB-vaccinated and *Streptococcus agalactiae*-challenged Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, [S./], v. 94, p. 249-257, 2019.

LANCEFIELD, R. C.; HARE, R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. **The Journal of experimental medicine**, [S./], v. 61, n. 3, p. 335, 1935.

LOVSHIN, L. L.; CYRINO, J. E. P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Anais [...]**. Piracicaba: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1998. p.1-20.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod Biol**, [S./], v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

- MAGNADÓTTIR, B. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): II. The effects of size and gender under different environmental conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S.l.], v. 122, n. 2, p. 181-188, 1999.
- MARIANO, W. S. Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) expostos ao ar atmosférico. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 210-223, 2009.
- MARIANO, Wagner dos Santos. **Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae)** a exposição aérea. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP 2006.
- MATSUBARA, L. S. Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas**, [S.l.], v. 25, n. 4, p. 331-335, 1992.
- SHAHJAHAN, MD; ISLAM , MD JAKIUL; HOSSAIN, MD TAHMEED; MISHU , MOSHIUL ALAM; HASAN , JABED; BROWN, CHRISTOPHER. **Blood biomarkers as diagnostic tools: An overview of climate-driven stress responses in fish. Science of The Total Environment**, Volume 843, 2022,
- MISRA, C. K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S. C. Immune response, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings fed with levamisole supplemented diets for longer duration. **Aquaculture Nutrition**, [S.l.], v.15, p. 356-365. 2009.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, [S.l.], v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of immunotoxicology**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 47-57, 2008.
- ORTUÑO, J. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary immunology and immunopathology**, [S.l.], v. 85, n. 1-2, p. 41-50, 2002.
- 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.
- PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, [S.l.], v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PLUMB, JA. Infectious diseases of tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. **Tilapia aquaculture in the Americas**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1997. p. 212-228.

- RAKOCY, J. E. Tilapia aquaculture in the Americas. **World Aquaculture Society, Baton Rouge**, [S./], v. 1, p. 212-218, 1997.
- RAUTA, P. R. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: signaling pathways, expressions and immune responses. **Immunology letters**, [S./], v. 158, n. 1-2, p. 14-24, 2014.
- ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces**. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 1981.
- RODRIGUES, F. S. Sistema imune inato de peixes eo uso do alho como imunoestimulante: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, [S./], v. 9, n. 4, p. e152943014-e152943014, 2020.
- ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *In*: VIGO-PELFREY, C. (ed.). **Membrane lipid oxidation**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 151-170.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, [S./], v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.
- SELVARAJ, V. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function and infection with *Aeromonas hydrophila*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 57, n. 1, p. 39-48, 2005.
- SHAKYA, S. R.; LABH, S. N. Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, [S./], v. 2, n. 4, p. 44-47, 2014.
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, [S./], v. 47, p. 61-71, 1990.
- SIKKA, S. C. Andrology lab corner*: role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of andrology**, [S./], v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, [S./], v. 1, p. e78-86, 1996.
- SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, [S./], v. 327, p. 649–662, 2004.
- SOUZA, E. M. Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: Growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. **Aquaculture**, [S./], v. 504, p. 7-12, 2019.
- STICKNEY, R. R. Status of research on tilapia. *In*: COSTAPIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Ed.). **Tilapia aquaculture in the Americas**. Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. v.2. p.21-33.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *In*: CYRINO, J. E. P. (ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. p. 171-194.

WÓJCIK R, JANOWSKA E, MALACZEWSKA J, SIWICKI AK: Effect of β -1,3/1,6-D-glucan **on the phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats**. Bull Vet Inst Pulawy. 2009, 53: 241-246.

WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIUS, 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.

2SIQUEIRA-BATISTA, R. MENDONÇA, E. G.; GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; MIYADAHIRA, R.; ALVAREZ-PEREZ, M. C.; *et al.* Atualidades proteômicas na sepse. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 58, n. 3, p. 376-382, 2012