

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

Basia Schlichting Moromizato

Zootecnista

**EFEITO DO B-GLUCANO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
TILÁPIAS DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)
SUBMETIDOS AO TRICLORFON.**

Dracena

2023

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

Basia Schlichting Moromizato

Zootecnista

**EFEITO DO B-GLUCANO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
TILÁPIAS DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)
SUBMETIDOS AO TRICLORFON.**

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.

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

Dracena

2023

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

M828e

Moromizato, Basia Schlichting.

Efeito do β -glucano no sistema antioxidante de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos ao Triclorfon / Basia Schlichting Moromizato. -- Dracena: [s.n.], 2023.

100 f. : il.

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

Orientadora: Jaqueline Dalbello Biller

1. Aquicultura. 2. Compostos organofosforados. 3. Estresse oxidativo. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

O impacto esperado na sociedade desse trabalho está relacionado à gestão da tilapicultura no Brasil. Ao compreender os mecanismos de defesa imunológica dos peixes, especialmente diante de desafios como doenças infecciosas e o uso de compostos químicos na aquicultura, a pesquisa contribui para práticas mais sustentáveis. Isso pode resultar em melhorias na prevenção e tratamento de doenças, reduzindo a mortalidade dos peixes e minimizando as perdas econômicas associadas à aquicultura. Além disso, ao explorar imunostimulantes como o β -glucano, a pesquisa pode influenciar as práticas de manejo, promovendo a saúde dos organismos aquáticos e, por extensão, a segurança alimentar e a economia associada à produção de tilápias no Brasil.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA
DISSERTAÇÃO:

**"Efeito do β -glucano no sistema antioxidante de tilápias
do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos ao
triclorfon."**

AUTORA: BASIA SCHLICHTING MOROMIZATO

ORIENTADORA: JAQUELINE DALBELLO BILLER

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



Documento assinado digitalmente
JAQUELINE DALBELLO BILLER
Data: 29/08/2023 15:22:04 -0300
Verifique em <https://validar.jt.gov.br>

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

Profa. Assoc. VALQUÍRIA CAÇÃO CRUZ-POLYCARPO (Participação presencial)
Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de
Dracena - FCAT
- UNESP



Documento assinado digitalmente
JULIANA ANTUNES GALVÃO
Data: 29/08/2023 14:41:34 -0300
Verifique em <https://validar.jt.gov.br>

Professora Doutora JULIANA ANTUNES GALVÃO (Participação Virtual)
Depto de Agroindústria Alimentos e Nutrição / ESALQ - USP

Dracena, 02 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BASIA SCHLICHTING MOROMIZATO – Nascida em Campinas, SP no dia 23 de maio de 1993. No ano de 2021 concluiu sua graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – UNESP – Campus de Dracena. Durante sua graduação fez parte de diversos projetos, realizou cursos na área de piscicultura, participou de vários congressos e desenvolveu uma iniciação científica intitulada “Efeitos do desafio sub-letal com triclorfon sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona (GSH) em músculo de tilápia, *Oreochromis niloticus*.” realizada sob orientação da Prof^a Dr^a Jaqueline Dalbello Biller. Em agosto de 2021 iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal na Faculdade de Ciência Agrárias e Tecnológicas – UNESP, Campus de Dracena, com bolsa financiada pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), sendo que em 2023 submeteu sua dissertação à banca examinadora.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Silzeth Schlichting, que sempre se sacrificou por mim e que me incentivou. Soube ser minha mãe, meu pai, minha melhor amiga, minha professora e minha companheira mesmo que de longe. Pelo exemplo de carinho, de dedicação, inteligência e felicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não me deixar fraquejar perante os desafios que a vida nos impõe.

A minha mãe, que é meu alicerce, que mesmo de longe me enviava força e incentivo.

A Margot (minha border collie) por todo apoio emocional, amor e felicidade incondicional.

A Prof. Dra. Jaqueline Dalbello Biller por toda orientação, oportunidade e paciência, que serviram como pilares de sustentação para a conclusão deste trabalho. E mais do que toda orientação acadêmica, agradeço pela amizade e pelo carinho comigo todos esses anos.

A Prof. Dra. Camino Fierro-Castro por todo auxílio, sendo sempre muito atenciosa e amorosa, por toda ajuda prestada a mim mesmo estando longe fisicamente.

Ao LIA - Laboratório de Imunologia Animal da Unesp Dracena, por toda ajuda nos projetos e pelas longas horas de coletas e análises, pelo apoio e amizade, ao pessoal (Ingrid, Flaviane, Simone, Camila, Felipe, Thais e Prof^a Jaqueline).

Ao Prof. Dr. Fábio E. Mingatto pelo uso dos equipamentos e disponibilidade do LaBMet - Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica da Unesp Dracena.

A Prof. Dra. Flávia Thomaz Verechia Rodrigues pelo uso dos equipamentos, reagentes e disponibilidade do L@mpe – Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião da Unesp Dracena, por todo auxílio científico à minha pesquisa.

Aos Professores Dr. Alexandre Ninhaus Silveira e Dr. Celso Tadao Miasaki por sempre serem tão atenciosos e solícito comigo. A todas as suas considerações na qualificação.

À minha amiga Maria Júlia Von Stein dos Santos (in memória), que me ajudou em todo o processo do trabalho, que foi capaz de suportar todos os meus momentos de estresse durante o projeto, pelo companheirismo, os incentivos, os momentos de risadas e descontrações, as “jantinhas” especiais preparadas na nossa casa após longos períodos na faculdade fazendo coletas e análises. Você foi única, minha eterna gratidão minha amiga.

Aos pais da Maria Júlia (Fabrício e Eliane) e todos os seus familiares, por toda ajuda, carinho e conselhos que foram essenciais para o processo do luto e enfrentamento dessa jornada.

A Ayme por todo apoio, ombro amigo, choros, risadas, você apareceu no momento que eu realmente precisava, obrigada por cuidar de mim e dar continuidade ao nosso lar.

Aos meus melhores amigos Mariana Kontz, Beatriz Queiroz, Alice Helena, Victor Sotto e Caroline Ávila por sempre continuarem me apoiando e me incentivando, e principalmente por todos os conselhos levados a mim, todos os momentos de descontração que sempre foram importantíssimos para mim.

Agradecimento especial para a Edna Sayuri, Arianne C. da Silva, Heloísa e ao Fábio Rosas, por todo apoio e carinho, pela paciência e conselhos, por toda ajuda burocrática e técnica durante todos esses anos.

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

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do B-glucano sobre a imunidade da mucosa: produção de compostos humorais de defesa no muco de tilápias e análise do transcriptoma de citocinas pró-inflamatórias no GALT das brânquias e intestino" (EFFECT OF B-GLUCAN ON MUCOSAL IMMUNITY: PRODUCTION OF DEFENSE HUMORAL COMPOUNDS IN TILAPIA MUCUS AND ANALYSIS OF THE TRANSCRIPTOME OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN GALT OF GILLS AND INTESTINES), registrada com o nº 17/2022 – 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** – 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 **21/07/2022**.

Dracena, 21 de julho de 2022.



Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Conte. João Ribeiro de Barros, km 855- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil
Tel. (18) 3621-8200 – www.dracena.unesp.br – academico@dracena.unesp.br

RESUMO

A expansão da tilapicultura nas últimas décadas posicionou o Brasil como o quarto maior produtor global de tilápias (*Oreochromis niloticus*). O aumento das doenças infecciosas devido à intensificação aquícola despertou um interesse crescente na compreensão dos mecanismos de defesa desses organismos. O estudo do sistema imunológico em peixes é de grande importância global, pois permite a prevenção e tratamento dessas doenças, minimizando a mortalidade e as perdas econômicas associadas. Nesta pesquisa, o objetivo foi avaliar o potencial do β -glucano, um imunostimulante amplamente utilizado e investigado em peixes, em relação ao sistema imunológico, particularmente quando administrado após uma dose sub-letal de triclorfon, um composto organofosforado usado para combater parasitas em aquicultura. O estudo avaliou o estresse oxidativo no tecido do fígado da tilápia-do-Nilo, medindo a expressão de genes como proteína de choque térmico (HSP70), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione-S-transferase (GST- α), além de analisar as respostas antioxidantes enzimáticas de CAT, SOD e GPx, o desempenho de crescimento e parâmetros hematológicos. Os resultados mostraram que o consumo alimentar expressou diminuição nos animais que não foram expostos ao triclorfon aos 37 dias, enquanto a conversão alimentar foi maior nos animais que sofreram exposição ao triclorfon nesse período. Peixes alimentados com β -glucano por 37 dias, apresentaram aumento da SOD, indicando possível situação de estresse oxidativo. Já nos peixes alimentados com β -glucano por 22 dias e aqueles que foram expostos ao triclorfon apresentaram maior GR. Não houve diferença significativa na expressão do gene CAT e GST α . A expressão relativa do gene GPx foi menor nos animais alimentados com β -glucano não expostos ao triclorfon. O gene HSP70 mostrou uma maior expressão relativa nos animais alimentados com β -glucano aos 22 dias, mas uma menor expressão nos animais alimentados com β -glucano e que não foram expostos ao triclorfon. O uso do β -glucano induziu alterações significativas nas respostas antioxidantes no fígado, com a atividade hepática da CAT e do GPx sendo maior aos 37 dias nos animais alimentados com β -glucano, enquanto a atividade hepática do SOD foi maior aos 22 dias nesses animais. O uso do β -glucano elevou os níveis de leucócitos, trombócitos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos. Esses resultados sugerem que o uso do β -glucano pode promover melhorias consideráveis nas respostas antioxidantes e no estresse oxidativo em tilápias-do-Nilo.

Palavras-chave: Aquicultura. Compostos organofosforados. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The expansion of tilapia farming in recent decades has positioned Brazil as the fourth largest global producer of tilapia (*Oreochromis niloticus*). The increase in infectious diseases due to aquaculture intensification has sparked a growing interest in understanding the defense mechanisms of these organisms. The study of the immune system in fish is of great global importance, as it allows the prevention and treatment of these diseases, minimizing mortality and associated economic losses. In this research, the objective was to evaluate the potential of β -glucan, a widely used immunostimulant investigated in fish, in relation to the immune system, particularly when administered after a sub-lethal dose of trichlorfon, an organophosphate compound used to combat parasites in aquaculture. The study evaluated oxidative stress in Nile tilapia liver tissue, measuring the expression of genes such as heat shock protein (HSP70), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST- α), in addition to analyzing the enzymatic antioxidant responses of CAT, SOD and GPx, growth performance and hematological parameters. The results showed that food consumption decreased in animals that were not exposed to trichlorfon at 37 days, while feed conversion was higher in animals that were exposed to trichlorfon during this period. Fish fed with β -glucan for 37 days showed an increase in SOD, indicating a possible situation of oxidative stress. Fish fed with β -glucan for 22 days and those exposed to trichlorfon showed higher GR. There was no significant difference in CAT and GST α gene expression. The relative expression of the GPx gene was lower in animals fed with β -glucan not exposed to trichlorfon. The HSP70 gene showed a higher relative expression in animals fed with β -glucan at 22 days, but a lower expression in animals fed with β -glucan and that were not exposed to trichlorfon. The use of β -glucan induced significant changes in antioxidant responses in the liver, with hepatic CAT and GPx activity being greater at 37 days in animals fed with β -glucan, while hepatic SOD activity was greater at 22 days in these animals. The use of β -glucan increased the levels of leukocytes, thrombocytes, lymphocytes, eosinophils, neutrophils and monocytes. These results suggest that the use of β -glucan can promote considerable improvements in antioxidant responses and oxidative stress in Nile tilapia.

Keywords: Aquaculture. Organophosphorus compounds. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. - EXEMPLAR DE TILÁPIA-DO-NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)	26
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO TRICLORFON.....	27
FIGURA 3 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE SOD EM FÍGADO DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO, POR RT-PCR.....	69
FIGURA 4 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE SOD EM FÍGADO DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON, POR RT-PCR.	69
FIGURA 5 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE GPX EM FÍGADO DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON, POR RT-PCR.	70
FIGURA 6 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE CAT EM FÍGADO DE TILÁPIA ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON, POR RT-PCR.	70
FIGURA 7 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE GR EM FÍGADO DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON, POR RT-PCR.	71
FIGURA 8 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE GR EM FÍGADO DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON, POR RT-PCR.	71
FIGURA 9 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE GSTA EM FÍGADO DE TILÁPIA ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON, POR RT-PCR.	72
FIGURA 10 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE HSP70 EM FÍGADO DE TILÁPIA ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON, POR RT-PCR.	72
FIGURA 11 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE HSP70 EM FÍGADO DE TILÁPIA ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON, POR RT-PCR.	73
FIGURA 12 - RBC ($\times 10^6 \text{MM}^{-3}$) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON. .	73
FIGURA 13 - PARÂMETROS DE ERITROBLASTO (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	74
FIGURA 14 - PARÂMETROS DE LEUCÓCITO (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO EM DIFERENTES TEMPOS.	75
FIGURA 15 - PARÂMETROS DE LEUCÓCITO (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS EM DIFERENTES TEMPOS E EXPOSTAS COM TRICLORFON.	75
FIGURA 16 - PARÂMETROS DE LEUCÓCITO (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	76
FIGURA 17 - PARÂMETROS DE TROMBÓCITO (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	76
FIGURA 18 - PARÂMETROS DE LINFÓCITO (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	77
FIGURA 19 - PARÂMETROS DE NEUTRÓFILOS (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	77

FIGURA 20 - PARÂMETROS DE NEUTRÓFILOS (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO EM DIFERENTES TEMPOS.	78
FIGURA 21 - PARÂMETROS DE NEUTRÓFILOS (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS EM DIFERENTES TEMPOS E EXPOSTAS COM TRICLORFON.	78
FIGURA 22. PARÂMETROS DE MONÓCITOS (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	79
FIGURA 23. PARÂMETROS DE MONÓCITOS (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO EM DIFERENTES TEMPOS.	80
FIGURA 24. PARÂMETROS DE EOSINÓFILOS (μL^{-1}) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	80
FIGURA 25. PARÂMETROS DE VCM (FL) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	81
FIGURA 26. PARÂMETROS DE HCM (PG/CÉLULA) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS EM DIFERENTES TEMPOS E EXPOSTAS COM TRICLORFON.	81
FIGURA 27. PARÂMETROS DE CHCM (G/DL) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO EM DIFERENTES TEMPOS.	82
FIGURA 28. PARÂMETROS DE CHCM (G/DL) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	82
FIGURA 29. ATIVIDADE HEPÁTICA DA ENZIMA DA CATALASE (MÉDIAS $\pm$ EP, N=12) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.....	83
FIGURA 30. ATIVIDADE HEPÁTICA DA ENZIMA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (MÉDIAS $\pm$ EP, N=12) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON	84
FIGURA 31. ATIVIDADE HEPÁTICA DA ENZIMA DA GLUTATIONA PEROXIDASE (MÉDIAS $\pm$ EP, N=12) DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS COM TRICLORFON.	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SUAS ATIVIDADES.	34
TABELA 2 - ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE, SUA AÇÃO BIOLÓGICA E SEUS PRINCIPAIS LOCAIS DE AÇÃO.	34
TABELA 3 - FORMULAÇÃO DA RAÇÃO DA DIETA CONTROLE E COM B-GLUCANO.	60
TABELA 4 - SEQUÊNCIA DE PRIMERS ESPECÍFICOS DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS, FATORES DE TRANSCRIÇÃO E MARCADORES CELULARES USADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS RNAS TRANSCRITOS EXTRAÍDOS DO FÍGADO DA TILÁPIA-DO-NILO DO EXPERIMENTO.	64
TABELA 5 - DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM B-GLUCANO E EXPOSTAS AO PRAGUICIDA TRICLORFON.	68

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S rRNA	Proteína ribossomal 18S
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
C	Dieta controle
CA	Conversão alimentar aparente
CAT	Catalase
CGE	Célula granulocítica especial
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
ChE	Colinesterases
CL ₅₀	Concentração letal
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CT	Comprimento Total
P	Dieta controle exposta com triclorfon
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GP	Ganho em peso
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
GST α	Glutathione-S-transferase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HOCl	Ácido hidrocloreto
HRO ₂ ⁻	Hidroperoxila
HSP70	Proteína de choque térmico
LG-PAS	Leucócito granular PAS
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NE	Número de eritrócitos
O ₂ ⁻	Superóxido
O ₂	Oxigênio
OH	Hidroxila
OP	Composto organofosforado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PF	Peso médio final
PGK	Fosfoglicerato quinase
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR-RT	Real time quantitative PCR
RLs	Radicais livres
RNA	Ácido ribonucleico
RO ₂	Peroxila

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPL	Proteínas ribossomais
SOD	Dismutase do Superóxido
TBARS	Determinação da peroxidação lipídica
TCE	Taxa de crescimento específico
TEP	Taxa de eficiência proteica
TLRs	Receptors Toll-Like
TRC	Triclorfon
UBQ	Ubiquitina
VCM	Volume corpuscular médio dos eritrócitos
βG	Dieta β-glucano
βP	Dieta β-glucano exposta com triclorfon

LISTA DE SÍMBOLOS

β Beta

$\pm$ Mais-menos

® Registro de marca

μ l Microlitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	
1	INTRODUÇÃO 22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....25
2.1	Espécie Estudada 25
2.2	Triclorfon (TRC) 27
2.3	Imunoestimulante 28
2.4	β -glucano 30
2.5	A Influência do β -glucano Dietético na Imunidade Induzidos pelo Efeito Sub-letal do Triclorfon em Peixes 31
2.6	Sistema Antioxidante em Peixes 33
2.7	Sistema Imune em Peixes 37
2.7.1	Sistema imune inato 37
2.7.2	Sistema imune adquirido ou adaptativo 38
3	REFERÊNCIAS.....40
CAPÍTULO 2 - EFEITO DO β -GLUCANO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE TILÁPIAS-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) SUBMETIDOS AO TRICLORFON.....54	
RESUMO –.....54	
ABSTRACT – 55	
1	INTRODUÇÃO 56
2	OBJETIVOS 58
2.1	Objetivo Geral 58
2.2	Objetivos Específicos 58
3	MATERIAL E MÉTODOS.....58
3.1	Condições dos Biotérios 58
3.2	Aquisição dos Peixes 59
3.3	Dieta 59
3.4	Realização da Exposição com Praguicida (Triclorfon) 60

3.5	Delineamento Experimental	61
3.6	Descrição das Análises	63
3.6.1	Desempenho zootécnico	63
3.6.2	Análise da expressão relativa de genes do sistema oxidativo	64
3.6.3	Análises hematológicas	65
3.6.4	Análise de defesa antioxidante enzimática	65
3.6.5	Análise estatística	67
4	RESULTADOS	67
4.1	Desempenho Zootécnico	67
4.2	Determinação da Expressão Relativa dos Genes do Sistema Oxidativo em Peixes por qPCR-RT	69
a)	Expressão relativa do gene SOD	69
b)	Expressão relativa do gene GPx	70
c)	Expressão relativa do gene CAT	70
d)	Expressão relativa do gene GR	71
e)	Expressão relativa do gene GST α	72
f)	Expressão relativa do gene HSP70	72
4.3	Análises Hematológicas	73
a)	RBC($\times 10^6 \text{mm}^{-3}$):	73
b)	Eritroblasto (μL^{-1}):	74
c)	Leucócitos (μL^{-1}):	74
d)	Trombócito (μL^{-1}):	76
e)	Linfócito (μL^{-1}):	77
f)	Neutrófilos (μL^{-1}):	77
g)	Monócitos (μL^{-1}):	79
h)	Eosinófilos (μL^{-1}):	80
i)	Índices hematológicos:	81

4.4	Defesa Antioxidante Enzimática	83
a)	Catalase (CAT)	83
b)	Superóxido dismutase (SOD)	83
c)	Glutathione peroxidase (GPx)	84
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÃO	90
7	REFERÊNCIAS.....	91

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o quarto maior produtor mundial de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), que continua a ser o peixe mais cultivado na piscicultura brasileira. O crescimento acelerado da aquicultura no Brasil reflete o surgimento da piscicultura como uma atividade econômica viável para os agricultores rurais a partir da década de 1990. Esse desenvolvimento foi fortalecido pela criação da Secretaria Especial de Pesca e Aquicultura em 2003 e do Ministério da Pesca e Aquicultura em 2009. Com base nas demandas interna e global, espera-se que a tendência de expansão e intensificação se mantenha nos próximos anos. Em 2022, o país produziu um total de 550.000 toneladas de tilápia, representando 63,93% da produção nacional de peixes cultivados e um aumento de 3% em relação às 534.005 toneladas produzidas em 2021 (PEIXEBR, 2022).

Atualmente, no Brasil, mais de 64 espécies de organismos aquáticos são cultivadas, incluindo uma ampla variedade de peixes nativos da bacia amazônica e dos manguezais da região Centro-Oeste (FAO, 2023). Embora não seja uma espécie nativa, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), que é a principal espécie produzida no país, foi introduzida em conjunto com a tilápia-de-Zanzibar (*Oreochromis hornorum*), pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) em 1971. Os primeiros indivíduos foram introduzidos pelo DNOCS com o objetivo de fornecer alevinos para o repovoamento dos reservatórios públicos no Nordeste e promover o desenvolvimento da piscicultura (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2018). Consequentemente, a tilápia-do-Nilo se disseminou rapidamente em diversos corpos hídricos e propriedades no Nordeste e Sudeste, expandindo posteriormente para todo o território nacional (FAO, 2023).

A tilápia-do-Nilo tem sido estudada e produzida em todo o mundo, especialmente no Brasil. No qual, essa espécie se destaca por apresentar características distintas em relação a outras espécies cultivadas. Essas características incluem: um perfil mais adequado para a piscicultura, com índices zootécnicos favoráveis à sustentabilidade da produção; origem de clima tropical, o que possibilita a sua expansão para diversas regiões do país, graças à faixa de

temperatura ideal entre 26°C e 28°C; comportamento onívoro e capacidade de aceitar diversos tipos de alimentos; facilidade de manejo em várias fases do cultivo; além de apresentar boa rusticidade, o que permite um controle eficiente de reprodução e um bom rendimento de peso-carcaça. No Brasil, a produção comercial de tilápias é realizada principalmente em sistemas semi-intensivos e intensivos, sendo os métodos mais comuns e amplamente testados o cultivo em viveiros escavados e a produção em tanques-rede (SEBRAE, 2014).

A cadeia produtiva da tilápia-do-Nilo sofreu diversas etapas, que envolveram desde o repovoamento de peixes até a comercialização dos produtos. Essa evolução incluiu a participação de várias empresas de diferentes setores, inclusive multinacionais, no segmento da tilapicultura. Entretanto, o cenário produtivo enfrenta desafio tanto tecnológico quanto não tecnológico no que se refere à mecanização da produção. Essas barreiras incluem a necessidade de garantir a sustentabilidade dos ambientes de produção, o desenvolvimento de rações balanceadas adequadas à espécie e às regiões de produção, entre outros aspectos. A verticalização da produção, desde a fase inicial até a comercialização, apresenta vantagens como melhor rastreabilidade e a qualidade do produto, além de redução de custos e valorização do produto final (SIDONIO *et al.*, 2011).

Em relação à saúde animal, identifica-se a necessidade de controlar as infecções parasitárias em peixes, o que representa uma preocupação extremamente importante na aquicultura comercial (MAPA, 2022). Para o piscicultor, o uso de produtos químicos pode representar uma alternativa para reduzir as perdas econômicas associadas às epidemias. O triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroximetil fosfonato), um composto organofosforado (OP), é um dos produtos mais utilizados contra parasitas de peixes na aquicultura (TRUJILLO-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; DUNCAN *et al.*, 2020).

A maioria dos compostos organofosforados sofre degradação resultando em produtos menos tóxicos, no entanto, o triclorfon é uma exceção devido a sua instabilidade em meio aquoso. Conforme a temperatura e o pH aumentam, ocorre uma rápida hidrólise do triclorfon, formando o metabólito diclorvos, que é altamente tóxico e prejudicial para organismos não-alvo, tais como peixes, caranguejos e camarões (SOUMIS *et al.*, 2003). Segundo Chang (2006), a dosagem recomendada de triclorfon para o controle de ectoparasitas em lagoas varia entre 0,1 a 1 mg/L. Entretanto, observa-se que os agricultores não seguem essa recomendação e, de

maneira indiscriminada, fazem uso excessivo do triclorfon na aquicultura (ROTH *et al.*, 1993). Cabe ressaltar também a possibilidade de serem encontradas concentrações elevadas após pesadas chuvas, especialmente quando as áreas no entorno tenham sido recentemente expostas a altas doses destes praguicidas (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001).

Com o objetivo de mitigar o uso inadequado dessas doses, uma das estratégias preventivas é a administração oral de substâncias imunoestimulantes. Esses imunoestimulantes melhoram a capacidade imunológica dos peixes, ativando mecanismos de defesa específicos ou inatos e os não específicos (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2012). Situações de estresse nos peixes resultam em aumento da demanda energética devido ao aumento dos níveis sanguíneos de cortisol (DAVIS, 2003), bem como alterações hidroeletrolíticas, hematológicas e imunológicas. Essas alterações são transitórias e tendem a regressar aos valores iniciais (TORT *et al.*, 2016). No entanto, imunomoduladores, tais como o β -glucano, podem ser administrados para diminuir as respostas deletérias resultantes do estresse de manejo (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2016; TORT *et al.*, 2016).

Para um melhor entendimento, os β -glucanos são polímeros de glicose encontrados nas paredes de fungos, como *Candida albicans* e levedura *Saccharomyces Cerevisiae*. Eles apresentam diferentes pesos moleculares e graus de ramificação, que determinam sua efetividade como imunomoduladores. Os extratos de β -glucano com estrutura composta por cadeia principal com unidades de glicose ligadas por β 1-6 e cadeias laterais com ligações β 1-3 facilitam a estimulação dos mecanismos de defesa não específicos dos animais, incluindo os peixes (ROBERTSEN *et al.*, 1990; FIGUERAS *et al.*, 1998). Essa forma de β -glucanos é a mais utilizada como aditivo alimentar para organismos aquáticos (VALLEJOS-VIDAL *et al.*, 2016; SAKAI, 1999). No entanto, ainda não foi descrito um modo de ação conclusivo dos β -glucanos que resulte nos efeitos imunomodulatórios sobre o organismo. Permanece a questão se a ação sistêmica resultante desses imunoestimulantes ocorre de forma direta sobre os leucócitos ou de forma indireta sobre as populações microbianas no intestino, entre outros (VALLEJOS-VIDAL *et al.*, 2016; DALMO; BOGWALD, 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécie Estudada

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é originária da África e da Ásia e foi introduzida no Brasil na década de 1970 (PINHEIRO, *et al.*, 2006), tem sido pesquisada e produzida em todo o mundo. A tilapicultura vem se mostrando uma ótima alternativa para a piscicultura de água doce, com índices zootécnicos interessantes para a sustentabilidade da produção. Segundo Meurer *et al.* (2003) a tilápia é uma espécie onívora, com características próprias, como boa aceitabilidade alimentar, facilidade no manejo de cultivo, alta resistência, reprodutibilidade e bom rendimento de peso-carcaça.

Os viveiros escavados são os meios produtivos mais utilizados e difundidos no Brasil para produção de peixes. A construção desses viveiros requer um custo considerável e, por isso, é necessária a utilização de engenharia adequada, principalmente para a otimização de despesas com movimentação de terra e adequação das unidades produtivas ao relevo do local de implantação. Já o sistema de tanques-rede (gaiolas) tem se desenvolvido no país por meio do uso de águas públicas federais e estaduais oriundas de usinas hidroelétricas. Esse sistema consiste na utilização desses corpos d'água para instalação dos tanques, feitos de estruturas de tela, onde os peixes são confinados e alimentados com ração. Esse tipo de cultivo privilegia a criação em sistema intensivo, devido à produção em altas densidades. Ademais, pode-se exaltar a facilidade de manejo (uma vez que a atividade produtiva é planejada), o arraçoamento e, principalmente, a despesca de forma fracionada, em detrimento da dificuldade na utilização dos tanques escavados (SCHULTER; VIEIRA FILHO 2018).

O ciclo produtivo da tilápia (Figura 1) no Brasil tem variado bastante de acordo com a região. Ao analisar os dados produtivos de cada estado, temos em destaque o Paraná, que produziu em torno de 172 mil toneladas no ano de 2020, em seguida o estado de São Paulo, com um progresso de 20% em sua produção em 2020. Esse crescimento é correlacionado a normatização ambiental, investimentos públicos e escoamento do produto, já que é um polo de consumo de pescados (SNA, 2021). Dentro desse crescimento, alguns fatores chamam atenção, em especial a sanidade (GUDDING; VAN MUISWINKEL, 2013; OSMOND; COLOMBO 2019).

Figura 1. - Exemplar de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)



Fonte: arquivo pessoal.

A intensificação da produção pode desencadear condições de estresse, como o desbalanço alimentar, variações na temperatura da água, excesso de matéria orgânica e poluição no ambiente aquático, e tornam o ambiente propício para patógenos, que afetam a saúde dos peixes, levando infecções e mortalidade (YU *et al.*, 2007; DASH *et al.*, 2009). O aumento da densidade em um sistema de produção busca torná-lo mais eficiente, com altas densidades, associado a manejos de rotina, transporte e manipulação dos peixes, que causa déficit no funcionamento do sistema imune, tornando-os mais suscetíveis (SAKAI, 1999; PAVANELLI *et al.*, 2008; URBINATI *et al.*, 2004).

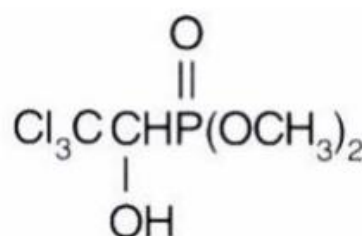
Os principais agentes patógenos encontrados em pisciculturas são fungos, vírus, parasitos e bactérias (TAVECHIO *et al.*, 2009). Doenças bacterianas, podem ocasionar prejuízos na produção, e elevar as taxas de mortalidade nas pisciculturas ou podem deixar sequelas que impedem a chegada do produto final às prateleiras (LEIRA *et al.*, 2017). As bactérias que mais acometem as pisciculturas são dos gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Streptococcus*, *Edwardsiella* e *Francisella* (SILVA, 2020).

Como tentativa de conter os prejuízos causados pelos patógenos nas produções, os praguicidas são eficazes contra parasitas infecciosos externos e internos. No entanto, seu uso indiscriminado pode causar efeitos deletérios em animais aquáticos, poluição ambiental e resistência anti-helmíntica (LU *et al.*, 2018).

2.2 Triclorfon (TRC)

Os praguicidas são amplamente utilizados globalmente para o controle de pragas, tanto na agricultura quanto na piscicultura (JORDAAN *et al.* 2013). O triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroximetil fosfonato) (Figura 2) é um inseticida e acaricida organofosforado, solúvel em água, amplamente utilizado no controle de várias pragas em campos, residências, plantas ornamentais, bem como no combate a parasitas em animais domésticos e peixes (LOPES *et al.*, 2006).

Figura 2 - Estrutura química do triclorfon



Fonte: Elaborado pelo autor.

O triclorfon - tem como característica no ambiente, degradação rápida em solos aeróbios, não sendo absorvido e, desta forma, tende a ir para água subterrânea (EXTOXNET, 1996; EPA, 1997). A hidrólise do TRC ocorre rapidamente, gerando o metabólito diclorvos, que é um organofosforado (OP) extremamente tóxico, devido a sua alta atividade anticolinesterásica (ETO, 1974; HOFER 1981).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o classifica como de classe toxicológico II – altamente tóxico. O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), em sua Resolução nº 357/05 classifica os corpos d'água naturais, fixa parâmetros para lançamento de efluentes e estabelece que as águas de classe I destinados à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral, devem apresentar níveis máximos de concentrações de praguicidas organofosforados de 10 µg/L (BRASIL, 2005).

O TRC é utilizado para o controle de vários parasitas em peixes e outros animais aquáticos, incluindo *Anancanthorus spp.*, *Argulus spp.*, *Dactylogyrus spp.*, *Gyrodactylus spp.*, *Dolops spp.*, *Trichodina spp.*, *Piscicola spp.*, *Ichthyophthirius spp.*, e *Piscinoodinium spp.* (TRUJILLO-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Apesar de seu

potente efeito antiparasitário e de sua curta meia-vida na água (aproximadamente 57 horas), estudos recentes sugerem que o TRC contamina ambientes aquáticos devido ao uso repetido, indiscriminado e excessivo no manejo de piscicultura, representando uma séria ameaça ao meio ambiente e na forma de toxicidade para peixes alvo e não alvo (BALDISSERA *et al.*, 2019; YONAR *et al.*, 2020).

O Brasil é classificado como maior consumidor de praguicidas, representando cerca de 20% do consumo mundial (ALBUQUERQUE *et al.* 2016). Atualmente, é o praguicida OP mais difundido entre os piscicultores (DUNCAN *et al.*, 2020). E a concentração recomendada varia de acordo com as espécies e o tipo de infestação parasitária, variando de 0,25 a 25 mg/L, conforme informações fornecidas pela empresa fabricante do TRC (BALDISSERA *et al.*, 2019; WOO; CHUNG, 2020).

Nas pisciculturas brasileiras, o tratamento com TRC é utilizado em episódios de infestação por parasitas monogenéticos (girodactíleos e dactilogirídeos) (GOVEN *et al.*, 1980; PAVANELLI *et al.* 2002) e no controle de infestações por *Argulus* sp e *Lernaea* sp, dois tipos comuns de crustáceos ectoparasitas encontrados em uma grande variedade de peixes (LOPES *et al.*, 2006; PAVANELLI *et al.*, 2002). O *Argulus* sp e *Lernaea* sp causam lesões ulcerosas nos peixes e, em episódios mais graves, podem comprometer a musculatura, resultando em hemorragias intensas e facilitando a penetração e instalação de fungos e bactérias (PAVANELLI *et al.*, 2002). Nesse sentido, o uso do TRC pode ser uma alternativa para os piscicultores reduzirem as perdas econômicas causadas por esses parasitas em suas criações.

No entanto, há alternativas mais viáveis e menos prejudicial ao meio ambiente, como o uso de imunoestimulantes, que além de causar resistência aos patógenos, leva a substituição dos antibióticos. Os imunoestimulantes são oferecidos com o intuito de prevenir doenças causadas pelos patógenos, pois agem elevando a imunidade, e causando respostas fisiológicas mais acentuadas (DÜGENCI *et al.*, 2003).

2.3 Imunoestimulante

Os imunoestimulantes são utilizados com o objetivo de prevenir a ação de agentes patogênicos no organismo animal e melhorar as variáveis de desempenho zootécnico. Além disso, a busca por uma alimentação nutricionalmente adequada e de baixo custo promove o uso de suplementos, incluindo os imunomoduladores. Esses suplementos não apenas reduzem as enfermidades, mas também são

capazes de aumentar o desempenho zootécnico e a taxa de sobrevivência (SOUSA, 2010).

Segundo Saurabh e Sahoo (2008), os imunoestimulantes são substâncias que conseguem melhorar a resposta imune dos animais através dos mecanismos de defesa específicos e não específicos. Eles se ligam a receptores específicos que estão presentes nas membranas dos leucócitos, e dão início à sua ativação, potenciando a ação dos macrófagos, monócitos e neutrófilos (SAKAI, 1999).

Na aquicultura, os imunoestimulantes podem ser administrados por meio do alimento (via oral), que é a maneira mais prática e abrange um maior número de animais, além de causar menos estresse. Também é possível administrá-los por meio de banhos de imersão, que apresentam eficácia, mas podem dificultar a medição da dosagem de acordo com a quantidade de água. Outra forma de administração é a via injetável, que é a mais eficaz, porém também a mais estressante. A forma de ação pode variar de acordo com o método de administração utilizado (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Embora os imunoestimulantes sejam utilizados em todas as fases de vida dos animais, eles são especialmente indicados durante as etapas de larvicultura e alevinagem, nas quais os peixes estão mais suscetíveis a doenças (CHAGAS *et al.*, 2014; VASEEHARAN; THAYA, 2013). No entanto, quando aplicados por um período prolongado, podem causar tolerância no organismo e desencadear respostas imunossupressoras (SHAKYA *et al.*, 2014; SELVARAJ *et al.*, 2015).

Os imunoestimulantes são classificados de acordo com sua composição, podendo ser compostos químicos sintéticos, fatores nutricionais como vitaminas, hormonais ou substâncias biológicas provenientes de bactérias, polissacarídeos, vegetais ou animais (SAKAI, 1999; BILLER-TAKAHASHI, 2014). Apesar dos efeitos benéficos na imunidade dos animais, os compostos químicos podem levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana e dificultar a comercialização do produto devido à presença de resíduos nos filés, o que pode ser prejudicial para a saúde humana (CABELLO, 2006; ROMERO *et al.*, 2012). Estudos demonstram que imunoestimulantes de origem biológica possuem ação antiparasitária e antimicrobiana, sem causar danos ao meio ambiente e à saúde humana (CHAGAS *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2020).

As substâncias biológicas provenientes do alho (*Allium sativum*), nim (*Azadirachta indica*), linhaça (*Linum usitarissimim*), gengibre (*Zingiber officinale*),

babosa (*Aloe barbadensis*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e outros têm ação comprovadamente positiva sobre o sistema imunológico de peixes (LIMA, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Destaca-se o uso de β -glucano proveniente da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) como imunoestimulante na aquicultura. Esse composto biológico não deixa resíduos no produto final e não afeta a qualidade da água, tornando-o uma medida profilática. Além disso, atua no fortalecimento da imunidade inespecífica dos animais (FALCON, 2007).

2.4 β -glucano

Os estudos com glucanos tiveram início historicamente entre os anos de 1960 e 1970 (VOLOSKI, 2018). Essas substâncias são polissacarídeos descritos como compostos por ligações β -1,3 e β -1,6, e podem apresentar variações estruturais dependendo de sua origem, o que influencia sua forma de atuação no sistema imunológico (PILARSKI *et al.*, 2017). Fungos, plantas e leveduras são fontes de β -glucano, uma vez que os polissacarídeos estão presentes na estrutura de suas paredes celulares (LOPES, 2018).

Os β -glucano são identificados como PAMPs (Padrões Moleculares Associados à patógenos) pelos PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão) presente nas células, causando uma estimulação que gera respostas imunes inatas (VOLOSKI, 2018; LOPES, 2018). Esses compostos se ligam aos receptores específicos dos macrófagos, estimulando a fagocitose e aumentando a capacidade de combate aos patógenos. Além disso, promovem a produção de proteínas do sistema complemento e lisozimas, e podem reduzir as respostas a estímulos estressantes (MELLO, 2016; GARCIA, 2008). A administração de imunoestimulantes visa não apenas a imunomodulação, mas também a diminuição da imunossupressão causada pelo estresse (ANDERSON, 1992). Os receptores do tipo Toll (TLRs) são capazes de detectar os β -glucanos em peixes (PIETRETTI *et al.*, 2013), os quais, após o reconhecimento de um patógeno, promovem uma complexa sinalização em cascata no sistema imunológico (BALLOY *et al.*, 2005).

Dessa forma, o β -glucano exerce efeito imunomodulador por estar envolvido com a imunidade celular e humoral (TAKAHASHI *et al.*, 2001), atuando contra

infecções bacterianas, parasitária e fúngica (LIANG *et al.*, 1998; JUNG *et al.*, 2004). Sua ação imunomoduladora pode estar relacionada ao tipo de ligações glicosídicas, peso molecular, solubilidade em água e o grau de polimerização (FREIMUND *et al.*, 2003; KUBALA *et al.*, 2003). A administração oral de β -glucano apresenta vantagens, sendo que a dose e o tempo de administração são determinantes para seu efeito na resposta imune do hospedeiro (TSUKADA *et al.*, 2003).

2.5 A Influência do β -glucano Dietético na Imunidade Induzidos pelo Efeito Sub-letal do Triclorfon em Peixes

A aquicultura desempenha um papel crucial na segurança alimentar universal. No entanto, o desenvolvimento sustentável desse setor, considerando os impactos na biodiversidade, requer a implementação de soluções viáveis para os estressores ambientais presentes (DAWOOD *et al.*, 2019). O crescimento e a expansão da aquicultura estão sujeitos a diversos fatores estressantes ambientais (AWAD *et al.*, 2017), podendo favorecer a disseminação de fatores patogênicos e a infecção de animais aquáticos (DUAN *et al.*, 2017; VICENTE *et al.*, 2019; EL-DEEP *et al.*, 2019).

A poluição da água na aquicultura é um dos principais fatores estressantes que impactam direta ou indiretamente o metabolismo e bem-estar dos animais aquáticos (ZAHARAN *et al.*, 2018; DAWOOD *et al.*, 2019). Enquanto os agrotóxicos são utilizados pelos agricultores para melhorar a produtividade e qualidade dos cultivos, outros resíduos são considerados um perigo ambiental que ameaça a maioria dos organismos aquáticos (STORELLI 2008; SOLIMAN *et al.*, 2016). O uso de agrotóxicos resultou em contaminação ambiental, bioacumulação tecidual e riscos toxicológicos que podem afetar indiretamente a saúde humana (ABHILASH *et al.*, 2009).

Particularmente, embora o triclorfon (TRC) apresente baixo potencial para bioconcentração em peixes e curta meia-vida na água (LOPES *et al.*, 2006), este OP apontou efeitos imunossupressivos *in vitro* e *in vivo* em peixes, envolvendo efeitos tóxicos direto nas células e/ou órgãos imunes ou efeito indireto já que o sistema neuroendócrino é o alvo principal dos poluentes (DUNIER *et al.*, 1991, DUNIER; SIWIKI, 1993). O excesso de água poluída com TRC proveniente da aquicultura pode ocasionalmente contaminar o sedimento. O TRC apresenta uma meia-vida de reação no ar de 2,5 dias, sendo decomposto por radicais hidroxila gerados

fotoquimicamente. No solo, a meia-vida de dissipação do TRC varia entre <1 a 27 dias. No entanto, a falta de informações sobre as quantidades de TRC utilizadas nas indústrias aquáticas dificulta a avaliação do impacto desse composto no meio ambiente (WOO *et al.*, 2020).

Em peixes, o TRC atua inibindo a atividade da enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina nas sinapses entre as células nervosas e musculares. Essa inibição leva ao acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, intensificando os impulsos nervosos (MCHENERY *et al.*, 1997). A exposição ao TRC pode resultar em efeitos sub-letais, como disfunções fisiológicas (BALDISSERA *et al.*, 2019), alterações bioquímicas e comportamentais (WOO; CHUNG, 2020; BALDISSERA *et al.*, 2021) e alterações histológicas (OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2021), além de lesões letais que podem levar à morte (SILVA *et al.*, 2020).

A administração oral de diversos aditivos alimentares contendo moléculas bioativas tem sido amplamente estudada como forma de conferir resistência a doenças e aceleração da imunidade em espécies cultivadas (EL GOLLI-BENNOUR *et al.*, 2019; HUSSEIN *et al.*, 2019; RJEIBI *et al.*, 2019; ABDELKHALEK *et al.*, 2017; NEAMAT-ALLAH *et al.*, 2019; AMPHAN *et al.*, 2019; NEAMAT-ALLAH *et al.*, 2019). Dentre esses imunoestimulantes, o β -glucano é amplamente reconhecido e aplicado em animais aquáticos (PILARSKI *et al.*, 2017; EL-MURR *et al.*, 2019). Sua administração é proposta para reduzir a inflamação intestinal local, aumentar a imunidade local e, assim, aumentar a resistência contra doenças infecciosas e toxicidade (EL-MURR *et al.*, 2019; PETIT *et al.*, 2016).

De fato, o β -glucano apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, imunoestimulantes, antimicrobianos e reguladores da microbiota (JI *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2009; DAWOOD *et al.*, 2017; DAWOOD *et al.*, 2017). Recentemente, o β -glucano demonstrou melhorar o sistema imunológico e o bem-estar da tilápia-do-Nilo exposta à toxicidade do fipronil (EL-MURR *et al.*, 2019). O β -glucano apresenta benefícios significativos para animais aquáticos. Ele acelera a produção de linfócitos, fortalecendo a capacidade do organismo de resistir à infecção e estimulando a formação de anticorpos (NEAMAT-ALLAH *et al.*, 2020). Além disso, atua como antioxidante, protegendo os tecidos corporais contra danos oxidativos e removendo os radicais livres do corpo (PIETRETTI *et al.*, 2013).

O β -glucano também demonstrou efeito hepatoprotetor, regulando enzimas como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase

alcalina (ALP) e níveis de triglicerídeos, colesterol sérico total e proteína total. Adicionalmente, sua inclusão na dieta melhorou o desempenho do crescimento, a utilização de alimentos e a diversidade da microbiota intestinal em animais aquáticos (DAWOOD *et al.*, 2018; EL-MURR *et al.*, 2019).

2.6 Sistema Antioxidante em Peixes

Os peixes, como organismos aeróbicos, estão suscetíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio (Tabela 1). Para combater essas espécies, desenvolveram defesas antioxidantes que foram objeto de pesquisas desde a década de 1980 (HU *et al.*, 2014). Essas defesas antioxidantes podem ser compostas por agentes vitamínicos, minerais ou enzimas (Tabela 2). As enzimas são as primeiras linhas de defesa contra os radicais livres, que são grupos de átomos ou moléculas com elétrons não pareados em sua última camada eletrônica (HALLIWEL, 1992).

Tabela 1 - Principais espécies reativas de oxigênio e suas atividades.

Espécie	Estrutura química	Atividade (ação)
Radical superóxido	O_2^-	Na maioria das reações atua como agente redutor
Radical hidroxila	HO^-	DNA, proteínas, carboidratos e lipídios
Radical hidroperoxil	HO_2^-	Membranas biológicas
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Proteínas e lipídios
Oxegênio singleto	$^1O_2$	Mutações no DNA

Fonte: Adaptado de Garcez *et al.* (2004) e Oliveira e Schoffen (2010).

Tabela 2 - Enzimas do sistema antioxidante, sua ação biológica e seus principais locais de ação.

Enzimas	Ação biológica	Localização
Superóxido dismutase (SOD)	Catalisa a dismutação do O_2^- , convertendo-o em H_2O_2	Abundante nas células aeróbicas
Catalase (CAT)	Catalisa a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2	Eritrócitos, baço, rins e fígado de mamíferos
Glutational peroxidase (GPx)	Catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos às custas da conversão da GSH para GSSG	Citosol

Fonte: Adaptado de Oliveira & Schoffen (2010).

O termo “radical livre” não é apropriado para designar todo o conjunto de agentes reativos deletérios, pois alguns não possuem elétrons desemparelhados em sua última camada, apesar de participarem de reações de oxirredução. Os termos mais adequados são “ERO” (Espécie reativas de oxigênio) e “ERN” (Espécie reativas de nitrogênio) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Em 1969, McCord e Fridovich descobriram a enzima superóxido dismutase (SOD), e a partir desse marco, o estudo dos radicais livres passou a ser difundido entre diversos pesquisadores, convencendo-os de sua importância na biologia. A investigação dos danos oxidativos causados por esses agentes em componentes celulares, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios e proteínas, foi iniciada (FRIDOVICH, 1999).

O acúmulo excessivo de “ERO” e/ou “ERN”, juntamente com a reduzida velocidade de sua remoção, pode levar o organismo a um estado conhecido como estresse oxidativo, favorecendo o dano oxidativo a biomoléculas (BARREIROS;

DAVID; DAVID, 2006). Para enfrentar esse estresse, as células possuem um sistema de defesa que opera em duas frentes: a primeira consiste em eliminar o agente causador do estresse antes que ocorra qualquer lesão, e a segunda visa reparar as lesões já existentes. A primeira frente se vale das defesas antioxidantes não enzimáticas, como a glutathione reduzida (GSH), vitamina E e ácido ascórbico. Já a segunda frente conta com a ação de enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GSH-Rd). A presença dessas enzimas foi observada na maioria das espécies de peixes (RUDNEVA, 1997).

A avaliação das proteções antioxidantes em espécies de peixes pode apresentar diferenças qualitativas e quantitativas, influenciadas pela diversidade das espécies, tecidos estudados, sazonalidade, nutrição e outros fatores (MATKOVICS *et al.*, 1977). Em um estudo realizado com tilápia cultivada (GIFT, *Oreochromis niloticus*) a inclusão de β -glucano na dieta aumentou as atividades das enzimas antioxidantes, indicando uma resposta positiva no combate ao estresse oxidativo. Além disso, a diminuição do conteúdo de MDA (malondialdeído) ou ERO em diferentes tecidos sugere uma melhoria no status antioxidante geral do GIFT (ABDELHAMID *et al.*, 2020). Essas descobertas foram apoiadas por estudos anteriores que registraram a regulação positiva das atividades séricas de SOD, CAT e GPx (LU *et al.*, 2019; DAWOOD *et al.*, 2020b; DAWOOD *et al.*, 2020c) e a regulação negativa do nível sérico de MDA (LU *et al.*, 2019; DAWOOD *et al.*, 2020c; FATH EL-BAB *et al.*, 2022) em tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas com 0,01–0,15% de β -glucano.

No entanto, a exposição ao triclorfon induz a produção de ERO, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila e radicais superóxido. Essas EROs causam danos ao DNA, peroxidação lipídica (LPO) e oxidação de proteínas, resultando em estresse oxidativo (FENG *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2012). Os peixes absorvem praguicidas através das brânquias e da superfície do corpo, resultando em efeitos nocivos. Além disso, a diminuição das temperaturas pode induzir dano oxidativo ao DNA, LPO e alterações na osmolaridade em animais aquáticos (QIU *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio crítico entre oxidantes e antioxidantes é interrompido devido ao acúmulo excessivo de ERO. Essas EROs, estimuladas por poluentes, estão associadas a diferentes processos patológicos

envolvidos em muitas doenças que afetam os peixes e podem representar um possível mecanismo de reação tóxica em animais aquáticos (MONTEIRO *et al.*, 2006).

Já foi ilustrado que tóxicos ambientais podem induzir a expressão de certos genes associados a respostas toxicológicas de curto e/ou longo prazo que têm efeito profundo no desempenho geral dos peixes (LEE *et al.*, 2006). Assim, a avaliação das alterações da expressão gênica é aconselhável para monitorar o potencial efeito adverso do triclorfon na saúde dos peixes e permitir uma indicação precoce do impacto ecotoxicológico.

Nesse contexto, a cinética de expressão de importantes “genes biomarcadores” relacionados ao estresse e ao crescimento medidos em nível molecular tem imensa importância como uma “ferramenta de alerta precoce” sensível de estresse químico em peixes (CARAJAVILLE *et al.*, 2000, CHEVRE *et al.*, 2003, DE LA TORRE *et al.*, 2005). Embora os pesquisadores tenham investigado as alterações de expressão gênica induzidas por substâncias tóxicas em peixes, o uso de “genes biomarcadores” para avaliar o estresse geral em tilápia-do-Nilo a exposição ao triclorfon é bastante escassa.

É bem entendido que nenhum gene biomarcador único emergiu como um indicador amplamente utilizado para toxicidade sem alguma limitação (SMOLDER *et al.*, 2003). Além disso, a dinâmica de expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante enzimático e outros genes representativos da toxicidade celular, como a proteína de choque térmico 70 (HSP70), enzimas superóxido dismutase (SOD); peroxirredoxinas, catalase (CAT) e pelo sistema glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona s-transferase (GSTa) (HAGEDORN *et al.*, 2012). A expressão do gene alvo foi normalizada pelos níveis de expressão dos genes housekeeping não regulados β -actina e Ef-1 α .

Proteínas de choque térmico (HSPs) são proteínas de estresse que são reguladas por condições ambientais, fisiopatológicas, doenças e não relacionadas ao estresse. A HSP mais conservada e altamente expressa que é regulada no nível transcricional é a HSP70. Estudos demonstraram que a expressão de HSP70 pode ser estimulada em resposta a vários praguicidas (NAZIR *et al.*, 2001; XING *et al.*, 2013), metais pesados - (RAJESHKUMAR *et al.*, 2013) e temperatura (DEANE; WOO, 2005). A expressão mais notável é observada no fígado, que nos peixes serve como o principal tecido para a desintoxicação de praguicidas. A HSP70 está

envolvida em interações importantes com outros estresses oxidativos reguladores, o que consequentemente amplia a associação entre expressão gênica molecular e dano celular mediado por espécies reativas de oxigênio (BROOME *et al.*, 2006).

2.7 Sistema Imune em Peixes

O sistema imunológico dos peixes é composto por células e compostos humorais que agem para defender o organismo contra qualquer material estranho. Esses materiais podem incluir micro-organismos, células malignas ou toxinas que entram em contato com o corpo do animal, causando contaminação e danos internos ou externos (BAYNE; GERWICK, 2001).

Os peixes, como todos os outros animais, também são suscetíveis a invasões parasitárias e infecções bacterianas, virais ou fúngicas. Quando o organismo do animal enfrenta alguma enfermidade, desencadeia rapidamente uma resposta de defesa chamada reação imunológica. Essa reação ativa todos os mecanismos do sistema de defesa que agem em conjunto para promover a proteção do organismo contra o agente causador da enfermidade, seja interna ou externamente (BALFRY; HIGGS, 2001).

A resposta imune do organismo pode ser adquirida ou não específica. A resposta imune adquirida é um processo específico induzido contra um agente externo por meio das imunoglobulinas. Já a imunidade natural, também conhecida como imunidade inata, aciona um mecanismo de defesa inato que confere ao hospedeiro a capacidade de resistir a infecções (SAKAI, 1999; ANDERSON, 1974).

2.7.1 Sistema imune inato

A resposta imune inata é um processo no qual atuam barreiras físicas, como a pele e muco, componentes celulares e humorais, tais como, células dendríticas, macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, citocinas, imunoglobulinas, lisozima e sistema complemento, entre outros (LOPES, 2018). O sistema inato é dividido em imunidade humoral e celular (BILLER, 2008).

A imunidade celular é representada por células de defesa, tais como trombócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos e células citotóxicas, que tem origem de produção em tecidos linfóides, sendo eles rim, baço e timo (EVANS, 1997). Os monócitos são células em movimento no sangue, de onde migram para o

tecido, durante um processo inflamatório, transformando-se em macrófagos. Os monócitos apresentam grande atividade fagocitária (CUESTA *et al.*, 1999, URBINATI *et al.*, 2014). Além dos monócitos e macrófagos, as células B e os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) têm potente ação fagocítica (SEPULCRE *et al.*, 2007; ØVERLAND *et al.*, 2010). Neutrófilos por serem células que realizam fagocitose, atuam contra infecções (LEHMANN *et al.*, 1987).

Os eosinófilos estão presentes no tecido conjuntivo, onde atuam no processo de inflamação e na defesa celular por degranulação quando ocorre infecção por patógenos (HINE, 1992). Os linfócitos são células conhecidas como “natural killer” células estranhas, sem que estas expressem algum antígeno ativador da resposta imune específica (RAULET, 2004).

Já a imunidade humoral é caracterizada por substâncias não específicas presente em fluidos corpóreos, tais como muco, soro e ovos de peixes, contamos com a lisozima, interferon, proteína C reativa, transferrina, lectina e sistema complemento. E agem inibindo a proliferação de patógenos no organismo animal (BILLER, 2008). Além de células, várias moléculas estão envolvidas nos mecanismos de defesa inata, as quais são conhecidas como mediadores regulatórios solúveis, altamente tóxicos, que são enzimas degradativas e peptídeos antimicrobianos que dão proteção máxima contra um número de patógenos e evitam danos aos tecidos hospedeiros (VERLHAC *et al.*, 1996; RIEGER; BARREDA, 2011).

2.7.2 Sistema imune adquirido ou adaptativo

O sistema imune adquirido ou adaptativo atua quando o animal é exposto a um antígeno, e ocorre produção de anticorpos. Esse sistema apresenta ativação posterior sendo que no primeiro momento acontece a produção dos linfócitos T, tendo seus respectivos receptores para identificar seus antígenos específicos (DIXON *et al.*, 1995). Os linfócitos são as células de memória, que conseguem memorizar o patógeno e executar respostas rápidas no organismo, caso o mesmo venha a ser infectado novamente (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A resposta adquirida nos peixes é composta por linfócitos T e B, imunoglobulinas, citocinas, entre outros (WATTS; MUNDAY, 2001). O linfócito B ao fazer o reconhecimento do antígeno informa as outras células, originando assim as células de memória, que produzem os anticorpos específicos para mostrar os

patógenos, fazendo assim com que o sistema imune possa remover. Já os linfócitos T, atuam reconhecendo os antígenos que entram em contato com os receptores dos macrófagos (células fagocíticas), fazendo com que eles se multipliquem (BILLER, 2008).

Tanto no sistema adaptativo dos peixes, como no sistema imune inato, existem as respostas humorais e celulares que promovem uma proteção interna e externa contra agentes patogênicos (IWAMA; NAKANISHI, 1996). À medida que o organismo é atacado por agentes patogênicos, o mesmo irá se defender através da interação dos elementos do sistema imune, agindo em combinação ou separadamente (FERNANDEZ, 2002). No sentido de melhorar o sistema imune dos peixes e de prepará-los para melhor enfrentar os estressores nos diferentes sistemas de criação, muitas substâncias vêm sendo utilizadas para potencializar a reposta imunológica. Entre estas substâncias estão diferentes tipos de imunoestimulantes (SAKAI, 1999; MEENA *et al.*, 2013; VALLEJOS-VIDAL *et al.*, 2016).

Assim, o objetivo desse estudo foi determinar se o β -glucano previne ou reduz o efeito sub-letal ao triclorfon comparando seu desempenho zootécnico, sua expressão de genes do sistema oxidativo no fígado, sua imunidade celular, o sistema antioxidante da atividade hepática em tilápias-do-Nilo (*O. niloticus*).

3 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; Lichtman, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2005. 580 p.
- ABDELHAMID, F.M.; ELSHOPAKEY, G. E.; AZIZA, A. E. Ameliorative effects of dietary *Chlorella vulgaris* and β -glucan against diazinon-induced toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish. Shellfish Immunol.**, v. 96, p. 213-222, 2020. DOI 10.1016/j.fsi.2019.12.009
- ABDELKHALEK, N. K.; EISSA, I. A.; AHMED, E.; KILANY, O. E.; EL-ADL, M.; DAWOOD, M. A.; HASSAN, A.M.; ABDEL-DAIM, M. M.. Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 54 (2017), pp. 99-104
- ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Pesticide use and application: an Indian scenario. **J. Hazard Mater.**, v. 165, n. 1, p. 1-12, 2009.
- AMPHAN, S.; UNAJAK, S.; PRINTRAKOON, C.; AREECHON, N. 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 Immunol.**, v. 87, p. 120-128, 2019.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 281–307, 1 jan. 1992.
- AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 67, p. 40–54, 1 ago. 2017.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; MEINHART, A. D.; DA SILVA, A. S.; BALDISSEROTTO, B. Behavioral impairment and neurotoxic responses of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to organophosphate pesticide trichlorfon: Protective effects of diet containing rutin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 239, p. 108871, jan. 2021.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; DESCOVI, S. N.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; MATOS, A. F. I. M.; SILVA, A. S.; BALDISSEROTTO, B.; GRIS, A.; MENDES, R. E. Distúrbio da homeostase energética e danos oxidativos provocados por triclorfom como mecanismos toxicológicos relevantes usando jundiá como modelo experimental. **Chem. Biol. Interagir.**, v. 299, p. 94-100, 2019.
- BALFRY, S. K.; HIGGS, D. A. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. *In*: LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Haworth Press, 2001. p. 213-225.
- BALLOY, V.; SI-TAHAR, M.; TAKEUCHI, O.; PHILIPPE, B.; NAHORI, M.-A.; TANGUY, M.; HUERRE, M.; AKIRA, S.; LATGÉ, J.-P.; CHIGNARD, M. Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5420–5425, set. 2005.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2007.

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

BAYNE, C. J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 8, p. 725–743, 12 out. 2001.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25–34, 1999.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; SABIONI, R. E.; URBINATI, E. C. Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 237–241, fev. 2012.

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, p. 425–429, maio 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. Imunoestimulantes e imunidade de organismos aquáticos. In: MALDI, R. R.; CAMPOS, C. M.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. **Patologia e sanidade de ambientes aquáticos**. Maringá: Editora Massoni, 2014. p. 295.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf. Acesso em: 14 dez. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888_07_05_2021.html. Acesso em: 14 dez. 2023.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, London, v. 8, n. 7, p. 1137–1144, 2006.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal

environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2–3, p. 295–311, 20 mar. 2000.

CHAGAS, E. C.; MAJOLO, C.; BOIJINK, C. L.; CHAVES, F. C. M.; HASHIMOTO, G. S. O.; FIGUEREDO, A. B.; MARTINS, M. L. Uso de óleos essenciais e extratos no tratamento de enfermidades de peixes. *In*: MALDI, R. R.; CAMPOS, C. M.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. **Patologia e sanidade de ambientes aquáticos**. Maringá: Editora Massoni, 2014. p.269.

CHEVRE, N.; GAGNE, F.; GAGNON, P.; BLAISE, C. Application of approximate site analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods. **Chemosphere**, v. 51, p. 13-23, 2003.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 71, n. 3–4, p. 161–171, 30 nov. 1999.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. β -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 384-396, 2008.

DASH, S. S.; DAS, B. K.; PATTNAIK, P.; SAMAL, S. K.; SAHU, S.; GHOSH, S. Biochemical and Serological Characterization of *Flavobacterium columnare* from Freshwater Fishes of Eastern India. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 2, p. 236–247, 2009.

DAVIS, K.; GRIFFIN, B.; GRAY, W. Effect of dietary cortisol on resistance to infection by *Ichthyophthirius* and mortality due to channel catfish virus. **Aquaculture**, v. 218, 1 mar. 2003.

DAWOOD, M. A. O.; AMER, A. A.; ELBIALY, Z. I.; GOUDA, A. H. Effects of including triticale on growth performance, digestive enzyme activity, and growth-related genes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 528, p. 735568, 15 nov. 2020.

DAWOOD, M. A. O.; EL-SHAMAA, I. S.; ABDEL-RAZIK, N. I.; ELKOMY, A. H.; GEWAILY, M. S.; ABDO, S. E.; SOLIMAN, A. A.; PARAY, B. A.; ABDELKHALEK, N. The effect of mannanoligosaccharide on the growth performance, histopathology, and the expression of immune and antioxidative related genes in Nile tilapia reared under chlorpyrifos ambient toxicity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 103, p. 421–429, ago. 2020.

DAWOOD, M.A.O., S. Koshio, M. El-Sabagh, M.M. Billah, A.I. Zaineldin, M.M. Zayed, A.A.E.-D. Omar. Changes in the growth, humoral and mucosal immune responses following β -glucan and vitamin C administration in red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**, 470 (2017), pp. 214-222

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; EL BASUINI, M. F.; HOSSAIN, M. S.; NHU, T. H.; MOSS, A. S.; DOSSOU, S.; WEI, H. Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 148–159, 2017.

DAWOOD, M. A. O.; 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. O.; ZOMMARA, M.; EWEEDAH, N. M.; HELAL, A. I. Synergistic effects of selenium nanoparticles and vitamin e on growth, immune-related gene expression, and regulation of antioxidant status of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Biological Trace Element Research**, v. 195, n. 2, p. 624–635, 1 jun. 2020.

TORRE, F. R. DE LA; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. **Chemosphere**, v. 59, n. 4, p. 577–583, 1 abr. 2005.

DEANE, E. E.; WOO, N. Y. S. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 330, n. 3, p. 776–783, 13 maio 2005.

DIXON, B.; ERP, S. H. VAN; RODRIGUES, P. N.; EGBERTS, E.; STET, R. J. Fish major histocompatibility complex genes: an expansion. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 19, n. 2, p. 109–133, 1995.

DORES, E. F. G. DE C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, p. 27–36, fev. 2001.

DUAN, Y.; ZHANG, Y.; DONG, H.; WANG, Y.; ZHANG, J. Effect of the dietary probiotic *Clostridium butyricum* on growth, intestine antioxidant capacity and resistance to high temperature stress in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Journal of Thermal Biology**, v. 66, p. 93–100, maio 2017.

DÜGENCI, S. K.; ARDA, N.; CANDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p. 99–106, set. 2003.

DUNCAN, W. P.; IDALINO, J. J. S.; SILVA, A. G.; MODA, R. F.; SILVA, H. C. M.; MATOSO, D. A.; GOMES, A. L. S. Toxicidade aguda do pesticida triclorfon e inibição da acetilcolinesterase em *Colossoma macropomum* (*Characiformes: serrasalminidae*). **Aquacult. Int.**, v. 28, p. 815–830, 2020.

DUNIER, M.; SIWICKI, A. K.; DEMAËL, A. Effects of organophosphorus insecticides: effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). III. In vitro effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in vivo effects on humoral response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 22, n. 1, p. 79–87, ago. 1991.

DUNIER, M.; SIWICKI, A. K. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, n. 6, p. 423–438, 1 nov. 1993.

EL GOLLI-BENNOUR, E.; TIMOUMI, R.; ANNAIBI, E.; MOKNI, M.; OMEZZINE, A.; BACHA, H.; ABID-ESSEFI, S. Protective effects of kefir against deltamethrin-induced hepatotoxicity in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 18, p. 18856–18865, 1 jun. 2019.

EL-DEEP, M. H.; DAWOOD, M. A. O.; ASSAR, M. H.; IJIRI, D.; OHTSUKA, A. Dietary Moringa oleifera improves growth performance, oxidative status, and immune related gene expression in broilers under normal and high temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 82, p. 157–163, maio 2019.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 8, p. 827–839, 12 out. 2001.

EL-MURR, A. E. I.; ABD EL HAKIM, Y.; NEAMAT-ALLAH, A. N. F.; BAESHEN, M.; ALI, H. A. Immune-protective, antioxidant and relative genes expression impacts of β -glucan against fipronil toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 94, p. 427–433, nov. 2019.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Registration Eligibility Decision (RED). **Trichlorfon**: office of prevention, pesticides and toxic substances (7508W). 1997. 190 p.

ETO, M. **Organophosphate pesticides**: organic and biological chemistry. Boca Raton: CRC Press, 1974.

EXTOXNET. **Extension toxicology network**. Pesticida Information Profiles- Trichlorfon. 1996. Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/pips/trichlor.htm> . Acesso em: 05 de março de 2023.

FALCON, D. R. **β -glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração**. 2007. 146 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2007.

FAO. Brasil. Divisão de Pesca e Aquicultura. **Texto de Suplicy, FM**. Roma: FAO, 2023. Disponível em: https://www.fao.org/fishery/en/countrysector/naso_brazil. Acesso em: 08 mar 2023.

FATH EL-BAB, A. F. *et al.* Dietary supplementation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with β -glucan and/or *Bacillus coagulans*: Synergistic impacts on performance, immune responses, redox status and expression of some related genes. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1011715, 23 set. 2022. DOI 10.3389/fvets.2022.1011715

FENG, T.; LI, Z. B.; GUO, X. Q.; GUO, J. P. Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulphate on antioxidant defense system and acetylcholinesterase of *Tilapia nilotica* in vitro. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 3, p. 107–113, nov. 2008. DOI 10.1016/j.pestbp.2007.10.002.

FERNÁNDEZ, A. B.; BLAS, I. D.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): células y órganos. **Revista AquaTIC**, n. 16, 8 set. 2016.

FIGUERAS, A.; SANTAREM, M.M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of β -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, p. 59-68, 1998.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D- glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v. 54, n.02, p. 159-171, 2003.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 893, p. 13-18, 1999.

GARCEZ, M.; BORDIN, D.; PERES, W.; SALVADOR, M. Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M.; HENRIQUE, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: Ulbra, 2004. p. 13-33.

GARCIA, F. **Suplementação alimentar com 'beta'-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. 2008. xi, 100f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2008.

GOVEN, B. A.; GILBERT, J. P.; GRATZEK, J. B. Apparent drug resistance to the organophosphate dimethyl (2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl) phosphonate by monogenetic trematodes. **J. Wild. Disease**, v. 16, p.343-346, 1980.

GUDDING, R.; VAN MUISWINKEL W. B. A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 6, p. 1683-1688, 2013.

HAGEDORN, M.; MCCARTHY, M.; CARTER, V. L.; MEYERS, S. A. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. e39397, 19 jun. 2012.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, p. 79- 88, 1992.

HOFER, W. Chemistry of metrifonate and dichlorvos. **Acta Pharmacol. Tóxico.**, v. 49, p. 7-14, 1981.

HU, K.; FENG, L.; JIANG, W.; LIU, Y.; JIANG, J.; LI, S.; ZHOU, X. Oxidative damage repair by glutamine in fish enterocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 1437-1445, 2014.

HUSSEIN, M. M. A.; ELSADAAWY, H. A.; EL-MURR, A.; AHMED, M. M.; BEDAWY, A. M.; TUKUR, H. A.; SWELUM, A. A.-A.; SAADELDIN, I. M. Endosulfan toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the use of lycopene as an ameliorative agent. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 224, p. 108573, 1 out. 2019.

JI, L.; SUN, G.; LI, J.; WANG, Y.; DU, Y.; LI, X.; LIU, Y. Effect of dietary β -glucan on growth, survival and regulation of immune processes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 64, p. 56–67, maio 2017.

JUNG, K.; HA, Y.; HA, S. K.; HAN, D. U.; KIM, D. W.; MOON, K. W.; CHAE, C. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to swine influenza by increased production of interferon- γ and nitric oxide. **Journal of Veterinary Medicine**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 72-76, 2004.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V., The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contributions to microbiology**, v. 15, p. 118-146, 2008.

KIM, Y.; KE, F.; ZHANG, Q.-Y. Effect of β -glucan on activity of antioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 336–340, 1 ago. 2009.

KUBALA, L.; RUZICKOVA, J.; NICKOVA, K.; SANDULA, J.; CIZ, M.; LOJEK, A. The effect of (1- 3)- β -D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, n. 24, p. 2835-2840, 2023.

LEE, SM.; LEE, SB.; PARK, CH.; CHOI, J. Expression of thermal shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* larvae (Diptera, chironomidae) exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker for freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, p. 1074 – 1081, 2006.

LEIRA, M. H.; LAGO, A. A.; VIANA, J. A.; CUNHA, L. T.; MENDONÇA, F. G.; FREITAS, R. T. F. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. **Nutri Time**, v. 14, n. 2, p. 15, 2017.

LEIRA, M.; LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; CIACCI, L. DA S.; CUNHA, L. T. DA; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; DIAS, N. P.; MELO, C. C. V. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **Pubvet**, v. 11, n. 06, 12 maio 2017.

LIANG, J.; MELICAN, D.; CAFRO, L.; PALACE, G.; FISETTE, L.; ARMASTRONG, R.; PATCHEN, M. L. Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 20, n. 11, p. 595-614, 1998.

LOPES, L. M. F. **β -glucana em respostas de estresse, imunidade e do metabolismo energético do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2018

LOPES, R. B.; PARAIBA, L. C.; CECCARELLI, P. S.; TORNISIELO, V. L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**, v. 64, n. 1, p. 56–62, jun. 2006.

LU, D.-L.; LIMBU, S. M.; LV, H.-B.; MA, Q.; CHEN, L.-Q.; ZHANG, M.-L.; DU, Z.-Y. The comparisons in protective mechanisms and efficiencies among dietary α -lipoic acid, β -glucan and L-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 785–793, mar. 2019.

LU, K.; XU, W.; LI, J.; LI, X.; HUANG, G.; LIU, W. Alterations of liver histology and blood biochemistry in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed high-fat diets. **Fisheries Science**, v. 79, n. 4, p. 661–671, 1 jul. 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de boas práticas na criação de peixes de cultivo**. 2022. Disponível em: https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/educacao-sanitaria/files/Manual_BP_cultivo_ISBN_ok2compressed-1.pdf. Acesso em: 08 mar 2023.

MATKOVICS, B.; NOVÁK, R.; HANH, H. D.; SZABÓ, L.; VARGA, S. I.; ZALESNA, G. A comparative study of some more important animal peroxide metabolism enzymes. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 56, p. 31-34, 1977.

MCHENERY, J. G.; LINLEY-ADAMS, G. E.; MOORE, D. C.; RODGER, G. K.; DAVIES, I. M. Experimental and field studies of effects of dichlorvos exposure on acetylcholinesterase activity in the gills of the mussel, *Mytilus edulis* L. **Aquatic Toxicology**, v. 38, n. 1–3, p. 125–143, maio 1997. DOI 10.1016/S0166-445X(96)00834-X

MELLO, M. M. M. **Uso do β -glucano e avaliação de indicadores de estresse e do sistema imune inato de pacus após manejo de transporte.**, 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura, 2016.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Influence of diet processing form on performance and survival of Nile tilapia during sex revert phase. **R. Bras. Zootec.**, v. 32, n. 2, p. 262–267, 1 abr. 2003.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A. DE; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 143, n. 2, p. 141–149, jun. 2006.

MURTY, A. **Toxicity of pesticides to fish**. 2 v. [S.l.]: CRC-Press, 1986.

NAZIR, A.; MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Expression of chlorpyrifos-induced hsp70 and effect on reproductive performance in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ). Bg 9 Bow. **Environment. Count. Toxic.**, v. 41, p. 443-449, 2001.

NEAMAT-ALLAH, A. N. F.; EL-MURR, A. ELHAKEEM I.; ABD EL-HAKIM, Y. Dietary supplementation with low molecular weight sodium alginate improves growth, haematology, immune reactions and resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Clarias gariepinus*. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 5, p. 1547–1556, 2019.

NEAMAT-ALLAH, A. N. F.; MAHMOUD, E. A.; ABD EL HAKIM, Y. Efficacy of dietary Nano-selenium on growth, immune response, antioxidant, transcriptomic profile and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus iniae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 94, p. 280–287, 1 nov. 2019.

NEAMAT-ALLAH, A. N. F.; ABD EL HAKIM, Y.; MAHMOUD, E. A. Alleviating effects of β -glucan in *Oreochromis niloticus* on growth performance, immune reactions, antioxidant, transcriptomics disorders and resistance to *Aeromonas sobria* caused by atrazine. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 5, p. 1801–1812, maio 2020.

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1333-1342, 2010.

OSMOND, A. T. Y.; COLOMBO, S. M. The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: advantages and challenges. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 3, p. 490-509, 2019.

ØVERLAND, H. S.; PETTERSEN, E. F.; RONNESETH, A.; WERGELAND, H., I. 667 Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and 668 Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.28, p.193–204, 2010.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Eduem, 2002. 305 p.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2008. 311 p.

PEIXE BR. **Anuário Peixe BR da Piscicultura**. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura, 2022.

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, nov. 2016.

PIETRETTI, D.; VERA-JIMENEZ, N. I.; HOOLE, D.; WIEGERTJES, G. F. Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard(®) and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 847–857, set. 2013.

PIETRETTI; D.; Vera-Jimenez, N. I.; Hoole, D.; Wiegertjes, G. F. 2013. Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. **Fish & Shellfish Immunology** v.3, p.847- 687 857.

PILARSKI, F.; FERREIRA DE OLIVEIRA, C. A.; DARPOSSOLO DE SOUZA, F. P. B.; ZANUZZO, F. S. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 25–29, nov. 2017.

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.

PINHEIRO, L. M. S.; PINHEIRO, L. E. L.; MARTINS, R.T. Aspectos técnicos da tilapicultura. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, n. 50, p. 75-80, 2006.

QIU, J.; WANG, W.-N.; WANG, L.-J.; LIU, Y.-F.; WANG, A.-L. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, v. 154, n. 1, p. 36–41, jun. 2011.

RAJESHKUMAR, S.; MINI, J.; MUNUSWAMY, N. Effects of heavy metals on antioxidants and HSP70 expression on different dairy fish tissues (*Chanos chanos*) from Kaattuppalli Island, Chennai, India. **Ecotoxicol. Environment. insurance**, v. 98 p. 8-18, 2013.

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

RIEGER, A. M.; BARREDA, D. R. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v.35, p.1238–1245. 2011.

RJEIBI, I.; BEN SAAD, A.; HFAIEDH, N. Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: The protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 84, p. 853–860, dez. 2016.

ROBERTSEN, B.; ROSTADT, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of nonspecific disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases**, v.13, p.391–400, 1990.

RODRIGUES, E. L.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PACHECO, F. J.; VEIGA, M. L. Histopathologic lesions in the livers of *Prochilodus lineatus* (*Pices, Prochilodontidae*) exposed to a sublethal concentration of the organophosphate insecticide Dipterex 500 (Trichlorfon). **Acta Sci.**, v.23, p. 503-505, 2001.

RODRIGUES, F. S.; CHAGAS, S. R.; ROCHA, M. C. V.; NASCENTE, E. de P.; PAULA, F. G.; PASCOAL, L. M. Innate immune system and the use of garlic as an immunostimulant: literature review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. e152943014, 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.

ROTH, M.; RICHARDS, R. H.; SOMMERVILLE, C. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases*, v. 16, n. 1, p. 1–26, jan. 1993. RUDNEVA, I. I. (1997). Blood antioxidant system of *Black sea elasmobranch* and teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 255-260.

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

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

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

SCHULTER, E. P., & VIEIRA FILHO, J. E. R. Desenvolvimento e Potencial da Tilapicultura no Brasil. **Revista De Economia E Agronegócio**, v. 16, n. 2, p. 177–201, 2018. DOI 10.25070/rea.v16i2.554

SEBRAE. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Criação de tilápias em tanques escavados**. Natal: Sebrae, 2014.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhancer survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v.19, p.293-306, 2015.

SEPULCRE, M. P.; LOPEZ-CASTEJON, G.; MESEGUER, J.; MULERO, V. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 2009–2016, 2007.

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**, v. 2, n. 4, p. 44-47, 2014.

RODRIGUES, L. S.; CAVALCANTI, I. M.; CAPANEMA, L. X. DE L.; MORCH, R. B.; MAGALHÃES, G.; FREIRE, J.; BURNS, V. A. C.; ALVES JÚNIOR, A. J.; MUNGIOLI, R. P. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, n. 35, p. 421- 463, 2011

SILVA, D. V. **Monitoramento da resistência à antimicrobianos na aquicultura: Isolamento e infecção experimental de tilapia do Nilo com *klebsiella pneumoniae***. 2020. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2020.

SMOLDER, R.; BERVOETS, L.; WEPENER, V.; BLUST, R. A conceptual framework for the use of mussels as biomonitors in the toxicity of whole effluents. **Zoom. Echo. Risk assessment.**, v. 9, p. 741-760, 2003.

SNA - SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Produção de peixes em 2020 atinge quase 803 mil toneladas no Brasil**. 2021. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/producao-de-peixes-em-2020-atinge-803-mil-toneladas-no-brasil/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SOFIA. **O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura (SOFIA) 2022**. Disponível em: <https://www.fao.org/publications/sofia/2022/en/>. Acesso em: 08 mar 2023.

SOLIMAN, N. F.; YACOUT, D. M. Aquaculture in Egypt: status, constraints and potentials. **Aquacult. Int.**, v. 24, n. 5, p. 1201-1227, 2016..

SOUMIS, N.; LUCOTTE, M.; SAMPAIO, D.; ALMEIDA, D. C.; GIROUX, D.; MORAIS, S.; PICHET, P. Presença de inseticidas organofosforados nos peixes do Rio Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 325–338, jun. 2003.

SOUSA, A. D. L. **Mananoligossacarídeo e β -glucano na suplementação dietária para juvenis de tilápia-do-nilo mantidos em tanques-rede**. 2010. 42 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2010.

STORELLI, M. M. Potential human health risks from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via seafood consumption: estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs). **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 8, p. 2782-2788, 2008.

SUNILA, I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). **Annales Zoologici Fennici.**, Helsinki, v. 24, p. 55-69, 1987.

TAKAHASHI, H.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Association of immunological disorders in lethal side effect of NSAIDs on β -glucan-administered mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, n.01, p. 1-14, 2001.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas Para a Prevenção E O Controle De Patógenos Em Piscicultura Alternatives for the Prevention and Control of Pathogens in Fish Farming. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335–341, 2009.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 35, p. 366-375, 2016. DOI 10.1016/j.dci.2011.07.002.

TRUJILLO-GONZÁLEZ, A.; BECKER, J. A.; VAUGHAN, D. B.; HUTSON, K. S. Parasitas monogenéticos infectam peixes ornamentais importados para a Austrália. **Parasitol. Res.**, v. 117, p. 995-1011, 2018.

TSUKADA, C.; YOKOYAMA, H.; MIYAJI, C.; ISHIMOTO, Y.; KAWAMURA, H.; ABO, T. Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β -glucan. **Cellular Immunology**, v. 221, n.01, p. 1-5, 2003.

URBINATI, E. C.; ZANUZZO, F. S.; BILLER-TAKAHASHI, J. D. Estresse e sistema imune em peixes. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 2014. Cap. 5. p.87-105.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura tropical**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 171-193.

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

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VASEEHARAN, B.; THAYA, R. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 22, n. 3, p. 1079–1091, jun. 2014.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHEPCHÜEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.143, p.123- 133, 1996.

VICENTE, I. S. T.; FLEURI, L. F.; CARVALHO, P. L. P. F.; GUIMARÃES, M. G.; NALIATO, R. F.; MÜLLER, H. DE C.; SARTORI, M. M. P.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 1, p. 80–92, 2019..

VOLOSKI, A. P. S. **Cicatrização de lesões cutâneas e imunomodulação em Jundiá expostos à β -glucana**. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

WATTS, M.; MUNDAY, B. L.; BURKE, C. M. DNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 153-164, 2001.

WOO, S. J.; CHUNG, J. K. Efeitos do triclorfom sobre o estresse oxidativo, neurotoxicidade e níveis de cortisol em carpa comum, *Cyprinus carpio* L., em diferentes temperaturas. **Comp. Bioquim. Physiol.**, C, v. 229, 108698, 2020.

WU, S. M.; LIU, J.-H.; SHU, L.-H.; CHEN, C. H. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 187, p. 202–213, set. 2015.

XING, H.; LI, S.; WANG, X.; GAO, X.; XU, S.; WANG, X. Effects of atrazine and chlorpyrifos on mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Chemosphere**, v. 90, p. 910-916, 2013.

MIŞE YONAR, S.; YONAR, M. E.; PALA, A.; SAĞLAM, N.; SAKIN, F. Effect of trichlorfon on some haematological and biochemical changes in *Cyprinus carpio*: The ameliorative effect of lycopene. **Aquaculture Reports**, v. 16, p. 100246, mar. 2020.

YU, V.L., HANSEN, D.S., KO, W.C., SAGNIMENI, A., KLUGMAN, K.P., VON GOTTFERG, A., GOOSSENS, H., WAGENER, M.M., BENEDI, V.J. The International Klebsiella Study group, virulence characteristics of Klebsiella and clinical manifestations of K. pneumoniae bloodstream infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, p. 986–993, 2007.

ZAHARAN, E.; RISHA, E.; AWADIN, W.; PALIĆ, D. Acute exposure to chlorpyrifos induces reversible changes in health parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 47–59, 1 abr. 2018.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DO B-GLUCANO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) SUBMETIDOS AO TRICLORFON

RESUMO – Este estudo teve como objetivo investigar o potencial papel do β -glucano na melhoria do desempenho zootécnico e da imunidade celular em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao praguicida triclorfon. Foram avaliados os indicadores do sistema antioxidante, incluindo a atividade hepática das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), bem como a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, como actina beta (β -actin_B), fator de alongamento (Ef-1 α), proteína de choque térmico (HSP70), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glutathione-S-transferase (GST- α), por meio de técnica de PCR RealTime em amostras de fígado. Além disso, foram analisadas seu desempenho zootécnico e a hematologia. O experimento foi conduzido no Laboratório de Imunologia Animal da Unesp, Campus de Dracena, com 540 juvenis de tilápias distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2, com 8 tratamentos: 2 dietas (controle - livre de β -glucano e com β -glucano) x 2 exposições (com triclorfon e sem exposição ao triclorfon) x 2 tempos (aos 22 e aos 37 dias de experimento), com 4 repetições para cada tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Os resultados indicaram que o uso do β -glucano pode induzir melhoras consideráveis nas respostas antioxidantes, refletidas nas expressões relativas dos genes relacionados ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Organofosforado; imunidade, enzimas; estresse oxidativo.

CHAPTER 2 - EFFECT OF β -GLUCANE ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) SUBMITTED TO TRICHLORFON

ABSTRACT – This study aimed to investigate the potential role of β -glucan in improving zootechnical performance and cellular immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to the pesticide trichlorfon. Indicators of the antioxidant system were evaluated, including the hepatic activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), as well as the expression of genes related to oxidative stress, such as actin beta (β -actin_B), elongation factor (Ef-1 α), heat shock protein (HSP70), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST- α), using the RealTime PCR technique in liver samples. In addition, their zootechnical performance and hematology were analyzed. The experiment was carried out at the Animal Immunology Laboratory of Unesp, Dracena Campus, with 540 tilapia juveniles distributed in a completely randomized design, in a 2x2x2 factorial scheme, with 8 treatments: 2 diets (control - free of β -glucan and with β -glucan) x 2 exposures (with trichlorfon and without exposure to trichlorfon) x 2 times (at 22 and 37 days of experiment), with 4 repetitions for each treatment. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and means were compared by Tukey's test (5%). The results indicated that the use of β -glucan can induce considerable improvements in antioxidant responses, reflected in the relative expressions of genes related to oxidative stress.

Keywords: Organophosphate; immunity, enzymes; oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a espécie eleita a ser estudada, é originária da África e da Ásia e foi introduzida no Brasil na década de 70 (PINHEIRO *et al.*, 2006). A tilapicultura vem se mostrando uma ótima alternativa para a piscicultura de água doce e estuarina. A expansão do cultivo da tilápia-do-Nilo deve-se ao ótimo desempenho, alta rusticidade, facilidade de obtenção de alevinos, adaptabilidade aos mais diversos sistemas de criação, grande aceitação no mercado de lazer (pesque-pague) e alimentícia (frigorífico) e pelas qualidades nutritivas e organolépticas da sua carne (MEURER, *et al.*, 2003).

Na aquicultura, os peixes alimentados com rações desbalanceadas ou que estejam mal-nutridos são susceptíveis às bactérias patogênicas e oportunistas (STOSKOPF, 1993; WOO; BRUNO, 1998). Além disso a dieta pode influenciar nos parâmetros imunológicos e na capacidade do animal aquático de resistir a doenças infecciosas (ALCORN *et al.*, 2003; BLAZER, 1991; LALL, 2000; LANDOLT, 1989; SITJA-BOBADILLA).

Os praguicidas acabam sendo de fácil acesso e eficazes contra parasitas infecciosos externos e internos; no entanto, seu uso indiscriminado pode causar efeitos deletérios em animais aquáticos. O triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroximetil fosfonato) é um composto organofosforado amplamente utilizado no controle de ectoparasitas de muitas espécies de peixes (BRANDAL; EGIDIUS, 1979; QIN; DONG, 2004; ZHANG *et al.*, 2014). No entanto, na água, o triclorfon é prontamente degradado em diclorvos, que é uma forma mais tóxica e ativa do composto principal (SAMUELSEN, 1987).

Embora os praguicidas sejam muito úteis na produção agrícola, eles permanecem em organismos não-alvo e no meio ambiente por períodos prolongados, podendo causar danos aos seres humanos. Além disso, estudos anteriores elucidaram uma relação entre toxicidade de praguicidas e crescimento reduzido em animais não-alvo (WOLTERING, 1984), provavelmente devido aos efeitos disruptivos de produtos químicos agrícolas na função enzimática e no metabolismo (COPPAGE; MATTHEWS, 1974).

Uma estratégia para combater os agentes patogênicos, é a utilização de alimentos funcionais, uma vez que beneficiam a nutrição, melhoram a eficiência alimentar e a taxa de crescimento, resultando em muitos momentos no equilíbrio da saúde destes animais atuando assertivamente a resistência. Dentre estes alimentos

utilizados na aquicultura, os imuno nutrientes (vitaminas e minerais), imunoestimulantes (prebióticos e probióticos) são os mais utilizados (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Tais compostos são de fácil administração, possuem baixa toxicidade para o hospedeiro e sua administração se dá através de imersão, injeção ou como um aditivo na dieta (SMITH *et al.*, 2003).

Os imunoestimulantes demonstraram relevante importância para peixes, bem como outros animais, pois são substâncias ou microrganismos capazes de modular o sistema imune pois, além do evitar o surgimento de doenças, colabora para a qualidade do ambiente aquático e, estimula o avanço do índice do desempenho zootécnico (CEROZI, 2012).

No entanto, não há na literatura informações sobre os efeitos que o imunoestimulante β -glucano pode causar quando associado ao triclorfon, seja antes ou após a exposição deste organofosforado. Além disso, a ação do triclorfon e do β -glucano pode ser influenciada por fatores ambientais, estresse de manejo, surgimento de doenças e ectoparasitas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel do β -glucano na melhora da imunidade, das defesas antioxidantes enzimáticas, do seu desempenho zootécnico, da histologia da mucosa intestinal e, a expressão de genes do sistema oxidativo da tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) submetidas à exposição sub-letal com triclorfon.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Elucidar se o imunoestimulante β -glucano provoca efeitos mais prolongados na imunidade frente à exposição sub-letal com triclorfon.

2.2 Objetivos Específicos

O presente trabalho teve como propósito avaliar o efeito do β -glucano em rações para tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos ao organofosforado triclorfon na expressão de genes do sistema oxidativo no fígado, imunidade celular, características histopatológicas dos tecidos do intestino, o desempenho produtivo e o antioxidante enzimático no fígado, por meio de testes de imunomodulação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições dos Biotérios

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Dracena, no biotério do Laboratório de Imunologia Animal (LIA). Foram utilizadas 24 caixas de polietileno com capacidade para 130 L de água. O sistema de água era aberto com renovação diária e monitoramento regular da temperatura da água mantida à $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Devido às disposições das caixas, foi utilizado uma iluminação programada para que todas as caixas tivessem acesso à 12h no período diurno e noturno.

A instalação possui um aerador elétrico acoplado às mangueiras de silicone com pedras porosas para promover adequada concentração de oxigênio dissolvido a água das caixas de polietileno. Os tanques foram cobertos por tela sombrite, a fim de se reduzir o estresse, como também evitando que haja saltos das tilápias de uma caixa para outra, ou até mesmo, que caíssem no chão, levando a óbito. A cada semana, a matéria orgânica depositada no fundo das caixas foi removida através de sifonamento com uma mangueira de borracha.

Para a realização da exposição ao organofosforado triclorfon, foram utilizados 12 aquários de vidro com capacidade de 100 L de água. O sistema de água era fechado, com oxigenação através da bomba de aquário submersa A300 e monitoramento regular da temperatura da água mantida à $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Devido às

disposições dos aquários e seu local utilizado, não foi necessária a utilização de iluminação programada.

3.2 Aquisição dos Peixes

Os juvenis de tilápia-do-Nilo invertida ou masculinizada (540 animais) com peso médio de 25 g e aproximadamente 10 cm foram adquiridos de produtores comerciais da região de Santa Fé do Sul - SP. Antes da fase experimental, os peixes foram aclimatados às condições laboratoriais por 30 dias em caixas de polietileno e alimentados duas vezes ao dia (8h e as 18h) com ração comercial para treinamento alimentar e engorda, e somente após esse período é que o experimento foi iniciado.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais, no dia 21/07/2022, registrada com o nº:17/2022-CEUA. Seguindo as normas segundo a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece normas para criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica.

3.3 Dieta

Para o presente experimento, foram confeccionadas duas dietas: Uma dieta controle (livre de β -glucano) e uma dieta experimental (0,1% de β -glucano), produzido no Instituto de Pesca de São José do Rio Preto – SP e formuladas de acordo com as exigências da espécie (Tabela 3).

As dietas foram feitas com alimentos e foram pesados, pré-misturados e moídos em moinhos do tipo martelo contendo peneira de 0,8 mm, para que houvesse a inclusão de suplemento mineral. Posteriormente, ocorreu a inclusão 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 de material plástico, identificados conforme o tratamento e a caixa, conservadas em refrigeração em todo o período do trabalho e passaram por pesagem diária.

Tabela 3 - Formulação da ração da dieta controle e com β -glucano.

Ingredientes	Ração	
	% Controle	% 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 ^a	0,500	0,500
Antifúngico	0,200	0,200
Sal	0,300	0,300
DL-metionina	0,168	0,168
Antioxidante ^b	0,050	0,050
Calcário	0,167	
Betaglucano ^c (60% ativado)		0,167
Total	100,00	100,00
Composição próxima (%)		
Proteína	34,000	34,000
Amido	27,000	27,000
Lipídio	6,130	6,130
Cinzas	8,870	8,870
Fibra bruta	3,270	3,270

^a Enriquecimento por quilo de ração: Vit. R: 12000 UI; Vit. D3: 3000 UI; Vit. E: 150,00 mg; Vit. B1: 20,00 mg; Vit. B2: 20,00 mg; Vit. B6: 17,50 mg; Vit. B12: 40,00 mg; Vit. C: 300,00 mg; Vit. K: 15,00 mg; ácido fólico: 6,00 mg; ácido pantotênico: 50,00 mg; biotina: 1,00 mg; cobre: 17,50 mg; ferro: 100,00 mg; iodo: 0,80 mg; manganês: 50,00 mg; niacina: 100,00 mg; zinco: 120,00 mg; colina: 500,00 mg; selênio: 0,50mg; cobalto: 0,40 mg.

^b O produto contém antioxidantes naturais, concebidos para proteger a alimentação animal da deterioração oxidativa e preservar a sua frescura. Contém tocoferol (ins 307), lecitina de soja (ins 322), extrato de óleo de alecrim, óleo de girassol alérgicos: contém derivados de soja, sem glúten.

^c β -glucano MacroGard® Biorigin, São Paulo, Brasil.

Fonte: elaborado por Giovani Sampaio Gonçalves.

3.4 Realização da Exposição com Praguicida (Triclorfon)

No presente trabalho foi utilizada a formulação comercial do praguicida organofosforado triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroximetil fosfonato, C₄H₈CL₃O₄P), Neguvon® 97% - Bayer, São Paulo, Brasil. A exposição foi realizada com imersão de peixes (n=12) à 0,05 mg/L⁻¹ do triclorfon em aquários de vidro (100

L), que consiste em 10% da concentração letal CL_{50} , sendo pesadas para cada aquário desafiado, em uma balança analítica e de precisão. O valor da CL_{50} do triclorfon para *O. niloticus* foi previamente estabelecido por Al-kahem *et al.* (1998), sendo de 0,05 mg. L⁻¹, ou seja, 10% da concentração sub-letal do princípio ativo triclorfon e dissolvido na água, durante 96 horas. Em seguida foi realizada a troca parcialmente da água dos aquários. O grupo controle foi submetido ao mesmo protocolo experimental, porém sem a adição do triclorfon. Após a troca parcial da água, foi realizado a coleta, completando 7 dias em aquários de sistema fechado.

3.5 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x2x2 com 8 tratamentos: 2 dietas (controle - dieta livre de β -glucano e dieta com β -glucano) x 2 tempos de alimentação (22 dias e 37 dias) x exposição (praguicida triclorfon e sem praguicida):

Tratamento 1 (C22): Alimentação com dieta controle (livre de β -glucano), seguida de amostragem aos 22 dias.

Tratamento 2 (P22): Alimentação com dieta controle (livre de β -glucano), exposição ao praguicida triclorfon por 96 horas em água, e amostragem aos 22 dias.

Tratamento 3 (β 22): Alimentação com dieta com β -glucano, sem praguicida, seguida de amostragem aos 22 dias.

Tratamento 4 (β P22): Alimentação com dieta com β -glucano, exposição ao praguicida triclorfon por 96 horas em água, e amostragem aos 22 dias.

Tratamento 5 (C37): Alimentação com dieta controle (livre de β -glucano) seguida de amostragem aos 37 dias.

Tratamento 6 (P37): Alimentação com dieta controle (livre de β -glucano), exposição ao praguicida triclorfon por 96 horas em água, e amostragem aos 37 dias.

Tratamento 7 (β 37): Alimentação com dieta com β -glucano, sem praguicida, e seguida de amostragem aos 37 dias.

Tratamento 8 (β P37): Alimentação com dieta com β -glucano, exposição ao praguicida triclorfon por 96 horas em água, e amostragem aos 37 dias.

Após o período de aclimação, os peixes foram submetidos a um jejum de 24 horas, coletados aleatoriamente, anestesiados com Eugenol (1g.10 L⁻¹ de água), individualmente pesados em balança digital semi-analítica, e medidos em ictiômetro. Nesta fase, foram utilizados 540 juvenis de tilápia-do-Nilo invertida ou

masculinizada, com o peso inicial médio de 75 g e aproximadamente 15 cm. Os peixes foram distribuídos no biotério do Laboratório de Imunologia Animal (LIA), em 24 caixas de polietileno com capacidade de 130 L ($\pm$ 23 peixes/caixa).

Durante o experimento, os peixes foram alimentados com as dietas experimentais: grupo Controle (dieta livre de β -glucano) e grupo β -glucano (dieta com β -glucano) até atingirem saciedade aparente, em duas refeições diárias (às 8h e às 18h). A saciedade aparente foi determinada quando os animais deixaram de consumir a ração, e as rações foram fornecidas em pequenas porções durante alguns minutos, com cautela e observando o comportamento do animal, para evitar sobras de ração. O consumo de ração foi medido diariamente, pesando os recipientes de armazenagem de ração (potes) de cada caixa individual.

Inicialmente, os peixes foram divididos em 4 grupos com 2 dietas distintas: grupo Controle (dieta livre de β -glucano) e grupo β -glucano (dieta com β -glucano). Dois grupos foram alimentados por 15 dias e os outros dois grupos por 30 dias, totalizando 6 caixas para cada grupo (24 caixas no total). Posteriormente, o grupo que recebeu as respectivas dietas por 15 dias foi transferido para aquários de sistema fechado e subdividido em 4 grupos: C22, P22, β 22 e β P22 (3 aquários de cada grupo, totalizando 12 aquários). Dois grupos, P22 e β P22, foram submetidos à exposição dos peixes a 10% da concentração letal (CL_{50}) por 96 horas (0,05 mg/L, Neguvon® 97%, Bayer, São Paulo, Brasil), para determinação das concentrações que foram utilizadas no desafio (3 aquários do grupo controle e 3 do alimentado com β -glucano). Todos os grupos, C22, P22, β 22 e β P22, continuaram recebendo suas respectivas dietas, até serem amostrados aos 22 dias de experimento.

O grupo que recebeu as respectivas dietas por 30 dias foi transferido para aquários de sistema fechado e subdividido em 4 grupos: C37, P37, β 37 e β P37 (3 aquários de cada grupo, totalizando 12 aquários). Dois grupos, P37 e β P37, foram submetidos a exposição com 0,05 mg/L de triclorfon por 96 horas (3 aquários do grupo controle e 3 do alimentado com β -glucano). Todos os grupos, C37, P37, β 37 e β P37, continuaram recebendo suas respectivas dietas, até serem amostrados aos 37 dias de experimento.

Os peixes de todos os tratamentos foram amostrados, anestesiados em solução de Eugenol (1g.10 L⁻¹ de água), sendo individualmente pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01 g medidos em ictiômetro para coleta de dados biométricos e avaliação das variáveis de desempenho produtivo (peso final;

ganho de peso; taxa de crescimento específico; conversão alimentar; taxa de eficiência proteica e fator de condição). Os peixes a serem sacrificados de cada aquário (n=12) passaram por coleta de sangue que foi processado para avaliação das variáveis imunológicas, hemograma completo (número de eritrócitos, hemoglobina, VCM, número total e diferencial de leucócitos), e em seguida foi coletado o fígado para avaliação da expressão dos genes β -actin_B, Ef-1 α , HSP70, CAT, SOD, GPx GR, GST- α por PCR RealTime desse tecido. As amostras de fígado também foram utilizadas para análise de compostos antioxidante enzimático.

3.6 Descrição das Análises

3.6.1 Desempenho zootécnico

Os animais foram distribuídos nas 24 caixas ($\pm$ 23 animais/caixa) com peso inicial médio de 75g e 15cm, para evitar algum possível efeito do peso individual dos animais nas respostas produtivas, os juvenis de tilápia-do-Nilo foram divididos em três faixas, cada uma representando um tamanho (P: até 40 g; M: até 60 g e G: maior que 65g), sendo distribuídos igualmente para cada caixa experimental, fazendo com que simulasse sua cadeia produtiva. Após o período de aclimação, os peixes receberam dois tratos ao dia, sendo o primeiro no período da manhã e o segundo no final da tarde, sendo os tratos oferecidos até aparentarem saciedade, ao final do segundo trato todos os potes eram pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01g e anotados os valores em planilhas.

Com os dados obtidos das biometrias realizadas ao longo do experimento, foram calculados os seguintes parâmetros de desempenho zootécnico:

- Peso médio final (PF);
- Comprimento Total (CT);
- Ganho em peso: GP (g) = (peso médio final – peso médio inicial);
- Taxa de crescimento específico: TCE (% dia-1) = $100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{período experimental}]$;
- Consumo de alimento (g);
- Conversão alimentar aparente: CA = alimento fornecido / ganho em peso total;
- Taxa de eficiência proteica: TEP (%) = $100 \times (\text{ganho em peso} / \text{proteína bruta consumida})$.

3.6.2 Análise da expressão relativa de genes do sistema oxidativo

Neste estudo, foram realizadas análises dos genes HSP70, CAT, SOD, GPX, GR e GST α por RT-PCR em tilápias-do-Nilo. O fígado dos peixes 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 dos genes.

O método qPCR-RT foi utilizado para a determinação molecular da expressão dos genes, empregando genes de referência ou manutenção (housekeeping) para a normalização dos resultados (PFAFFL, 2004; REBOUÇAS *et al.*, 2013). Foram utilizados primers específicos para amplificar e quantificar os genes alvo. O equipamento de qPCR em tempo real utilizado foi o iCycler iQ™ e a fluorescência emitida foi usada para analisar a quantidade do produto amplificado (PFAFFL, 2004).

O método de análise dos dados foi o comparativo de CT (2- $\Delta\Delta$ método de CT) (PFAFFL, 2004), calculando a partir de seis repetições biológicas independentes. A expressão relativa dos genes alvo foi comparada com o gene EF-1 α .

Tabela 4 - Sequência de primers específicos das citocinas pró-inflamatórias, fatores de transcrição e marcadores celulares usados para amplificação dos RNAs transcritos extraídos do fígado da tilápia-do-Nilo do experimento.

Gene	Sequência Fw/Rv (5'-3')	PB	Ta	Accession N°	Referência
β -actin_B	F: GTGCCCATCTACGAGGGTTA R: CTCTTTGATGTCACGCACGA	156	95°C	KJ126772	Mahmoud A. O. Dawood <i>et al.</i> 2020
EF-1 α _A	F: ATCAAGAAGATCGGCTACAACCTT R: ATCCCTTGAACCAGCTCATCTTGT	109	95°C	AB075952.1	Dong-Liang Lu <i>et al.</i> (2019)
Hsp70	F: CATCGCCTACGGTCTGGACAA R: TGCCGTCTTCAATGGTCAGGAT	107	95°C	FJ207463.1	J. Qiang <i>et al.</i> 2016
CAT	F: CCCAGCTCTTCATCCAGAAAC R: GCCTCCGCATTGTACTTCTT	103	95°C	JF801726.1/ XM_003447521	E, S. dos Reis Goes <i>et al.</i> 2019
SOD	F: TCCAGCCTGCCCTCAAGTT R: CCAAAGTCCCGTTTGATTGC	127	95°C	JF801727	Malachy N.O. <i>et al.</i> 2017
GPX	F: CGCCGAAGGTCTCGTTATTT R: TCCCTGGACGGACATACTT	107	95°C	NM_001279711.1	E, S. dos Reis Goes <i>et al.</i> 2019
GR	F: CATTACCGAGACGCGGAGTT R: CAGTTGGCTCAGGATCATTTG	420	95°C	XM_003445184.5	Abd elhakeem I. <i>et al.</i> 2019
GST α	F: TAATGGGAGAGGGAAGATGG R: CTCTGCGATGTAATTCAGGA	202	95°C	NM_001279635.1	Rui Jia <i>et al.</i> 2019

3.6.3 Análises hematológicas

No sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos (NE), concentração de hemoglobina (Bioclin K023, Quibasa química básica, Belo Horizonte, MG), volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem total e diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, célula granulocítica especial (CGE) ou leucócito granular PAS (LG-PAS) e basófilos) em extensões sanguíneas.

As amostras sanguíneas homogeneizadas foram introduzidas em capilares para microhematócrito para determinação do hematócrito. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 g em centrífuga de microhematócrito e a avaliação foi feita com o auxílio da tabela de microhematócrito.

Para a contagem do número de eritrócitos, alíquotas de sangue de cada animal foram coletadas e diluídas em tampão formol citrato na contração de 1:200. Após a homogeneização da solução a contagem foi feita em câmara de Newbauer.

Extensões sanguíneas de cada animal foram feitas em lâminas de vidro com extremidade fosca e deixadas para secar ao ar e submetidas à coloração com Panótico Rápido (Panótico Rápido LB 170117, Laborclin Produtos para Laboratório Ltda. Pinhais, PR) A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz no aumento de 100x, com óleo de imersão. A contagem total dos leucócitos e dos trombócitos foram realizadas por método indireto, pela quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas obtido no contador de células. Já para a contagem diferencial de leucócitos foram contadas 200 células e estimado para o total de leucócitos.

3.6.4 Análise de defesa antioxidante enzimática

As amostras de fígado foram inicialmente descongeladas para confecção de um homogenato na proporção de 1 g de tecido para 4 mL de tampão de homogeneização (Tris HCl 100mM, EDTA 0,1 mM e triton x-100 a 0,1%, pH 7,8). O homogenato foi preparado em um homogeneizador tipo Potter (Modelo NT 136 - Novatecnica®) a 600 rpm por aproximadamente 3 minutos cada amostra. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugados a 5000 rpm, por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) Allegra X-30R Centrifuge – Beckman Coulter®. Após centrifugação, os sobrenadantes foram

separados em alíquotas para análise da atividade das enzimas do estresse oxidativo. No mesmo dia de preparo dos homogenatos, foi quantificada a concentração de proteína de cada amostra pelo método de Biureto em espectrofotômetro a 540 nm.

3.6.4.1 Catalase (CAT)

A atividade hepática da CAT foi determinada medindo a diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio pela absorbância a 240 nm de acordo com Aebi (1984). O coquetel de reação consistiu em H_2O_2 10,6 mM preparado no momento da utilização. Foram utilizados 10 μL de amostra e 190 μL de H_2O_2 para a realização da leitura da atividade enzimática. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato por minuto sob as condições analíticas descritas. A atividade da CAT foi determinada pela absorbância de 240 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

3.6.4.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade hepática da SOD foi medida pelo método do ferricitocromo C usando xantina / xantina oxidase como fonte de radicais superóxido. O coquetel de reação consistiu em tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 7,8), EDTA a 0,1 mM, xantina a 0,1 mM, citocromo C a 0,013 mM e xantina oxidase a 0,024 UI mL^{-1} . Foram utilizados 180 μL de coquetel de reação, 10 μL de amostra e 10 μL de xantina oxidase para a realização da leitura da atividade enzimática. A atividade foi expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma inibição de 50% da taxa de redução do ferricitocromo C (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2009). A atividade da SOD foi determinada pela absorbância de 550 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

3.6.4.3 Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade hepática da GPx foi medida seguindo o método de Pérez-Jiménez *et al.* (2009). A glutathiona na forma oxidada (GSSG) gerada pela GPx foi reduzida pela glutathiona redutase (GR) e a oxidação de NADPH foi monitorada pela absorbância a 340 nm. O coquetel de reação consistiu em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,1), 3,6 mM de glutathiona reduzida (GSH), 3,6 mM de azida de

sódio, 1 UI/mL de glutathione redutase, 0,2 mM de NADPH e 1,2 mM de H_2O_2 . Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato μmol por minuto, nas condições analíticas descritas. A atividade da GPx foi determinada pela absorbância de 340 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

3.6.5 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Desempenho Zootécnico

Não houve diferença significativa na interação dietas (controle - livre de β -glucano e com β -glucano) x tempo (22 dias e 37 dias) x exposição (com triclorfon ou sem triclorfon), para as análises de peso médio final, comprimento total, ganho de peso, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica. Houve diferença significativa para o consumo e conversão alimentar nas interações estudadas, sendo que aos 37 dias o consumo e conversão alimentar foram maiores nos peixes do P e β P em comparação com C e β , e na comparação com P e β P aos 22 dias, respectivamente. O mesmo ocorreu para conversão alimentar (Tabela 5).

Tabela 5 - Desempenho zootécnico de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas ao praguicida triclorfon.

Variáveis	22 dias				37 dias			
	C	P	β	β P	C	P	β	β P
Peso médio final (gr)	104,3	91,60	92,90	104,70	139,60	122,7	106,00	106,70
Comprimento total (cm)	17,90	17,00	17,10	17,50	17,70	18,6	18,20	19,50
Ganho de peso (g)	27,60	12,60	18,90	22,40	67,10	44,3	34,30	31,60
Taxa de Crescimento Específico (%)	0,90	0,50	0,80	0,80	1,9	1,5	1,20	1,20
Consumo de Alimento (g)	202 A	286 B	295,7 A	234,7 B	237,7 bA	453,8 aA	198 bA	455,9 aA
Conversão alimentar	2,12 A	3,12 B	3,2 A	2,2 B	1,7 bA	3,7 aA	1,9 bA	4,3 aA
Taxa de Eficiência Proteica (%)	0,80	0,40	0,60	0,70	2,01	1,3	1,01	0,9

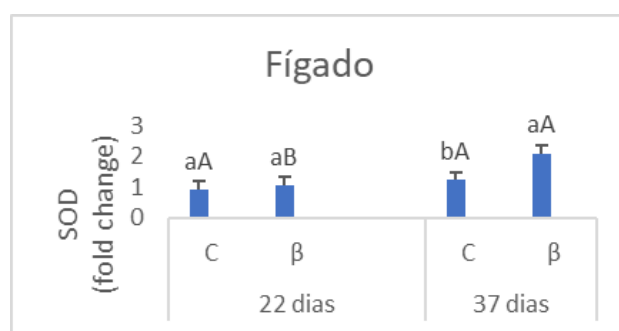
Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam tratamentos entre si, dentro dos dias 22 e 37 dias. Letras maiúsculas comparam tratamentos entre 22 e 37 dias.

4.2 Determinação da Expressão Relativa dos Genes do Sistema Oxidativo em Peixes por qPCR-RT

a) Expressão relativa do gene SOD

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na expressão do gene SOD. Peixes que receberam β -glucano por 37 dias apresentaram maior expressão da SOD quando comparado ao controle aos 37 dias, e aos peixes alimentados com β -glucano por 22 dias. Não houve diferença nos demais tratamentos (Figura 3).

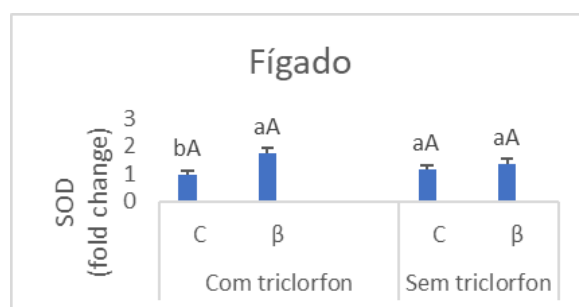
Figura 3 - Expressão relativa do gene SOD em fígado de tilápias alimentadas com β -glucano, por RT-PCR.



Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

Houve diferença significativa na interação dieta x exposição ao triclorfon sobre a expressão do gene SOD. Peixes que receberam β -glucano e exposição ao triclorfon apresentaram maior expressão da SOD quando comparado ao controle expostos ao praguicida. Já aos peixes alimentados com dieta controle não expostos ao triclorfon apresentaram maior expressão que o controle expostos ao praguicida. Não houve diferença nos demais (Figura 4).

Figura 4 - Expressão relativa do gene SOD em fígado de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon, por RT-PCR.



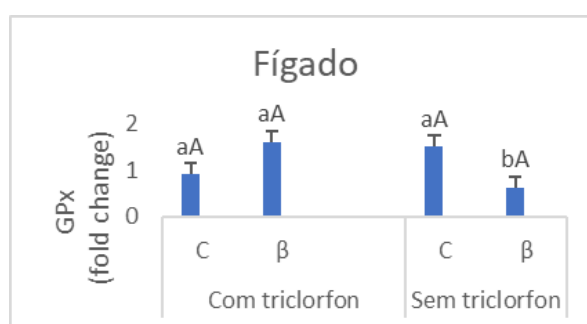
Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclorfon.

Letras maiúsculas comparam dietas dentro entre exposição ao triclorfon. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

b) Expressão relativa do gene GPx

Houve diferença significativa na interação dieta x exposição ao triclorfon sobre a expressão do gene GPx. Peixes alimentados com β -glucano não expostos ao triclorfon apresentaram menor expressão que o controle não expostos ao praguicida. Não houve diferença nos demais tratamentos (Figura 5).

Figura 5 - Expressão relativa do gene GPx em fígado de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon, por RT-PCR.

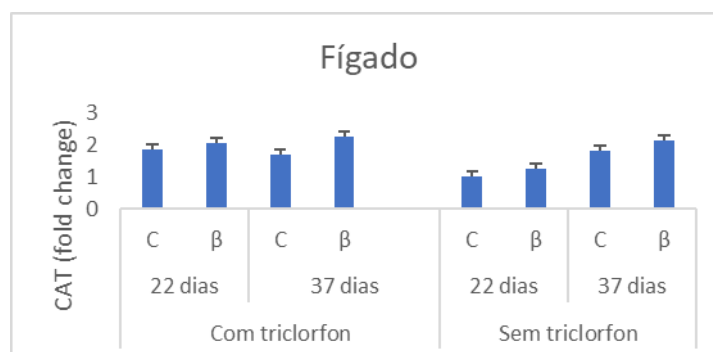


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

c) Expressão relativa do gene CAT

Não houve diferença significativa na interação dieta x tempo x exposição ao triclorfon sobre a expressão relativa do gene CAT (Figura 6).

Figura 6 - Expressão relativa do gene CAT em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon, por RT-PCR.

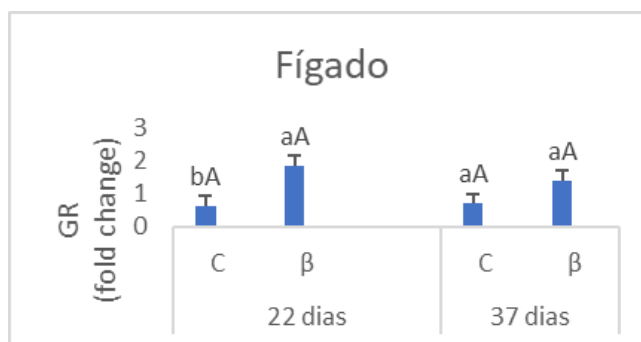


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

d) Expressão relativa do gene GR

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na expressão do gene GR. Peixes que receberam β -glucano por 22 dias apresentaram maior expressão da GR quando comparado ao controle aos 22 dias. Não houve diferença nos demais tratamentos (Figura 7).

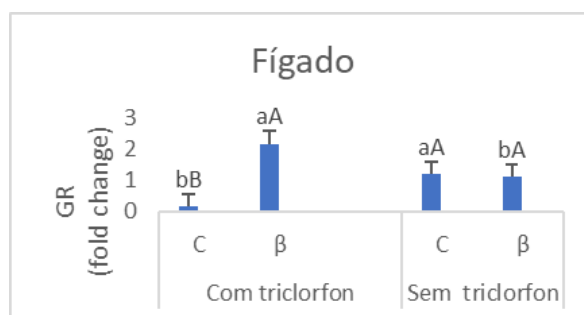
Figura 7 - Expressão relativa do gene GR em fígado de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclofon, por RT-PCR.



Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

Houve diferença significativa na interação dieta x exposição ao triclofon sobre a expressão do gene GR. Peixes que receberam β -glucano e expostos ao triclofon apresentaram maior expressão da GR quando comparado ao controle exposto ao praguicida. Já os peixes alimentados com β -glucano não expostos ao praguicida apresentaram menor expressão que o controle expostos ao triclofon. Os peixes do tratamento controle não expostos ao praguicida, apresentaram maior expressão de GR comparado ao controle expostos ao triclofon (Figura 8).

Figura 8 - Expressão relativa do gene GR em fígado de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclofon, por RT-PCR.



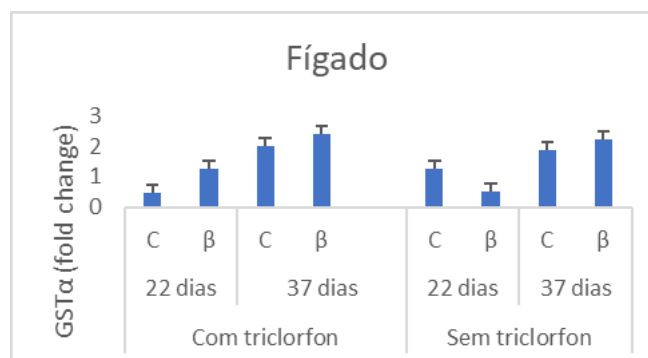
Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclofon.

Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

e) Expressão relativa do gene GST α

Não houve diferença significativa na interação dieta x tempo x exposição ao triclorfon sobre o gene GST α (Figura 9).

Figura 9 - Expressão relativa do gene GST α em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon, por RT-PCR.

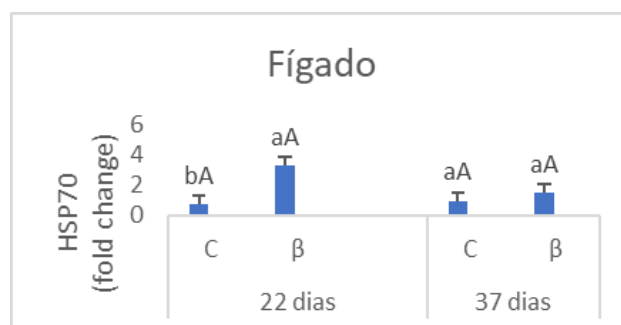


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$). C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

f) Expressão relativa do gene HSP70

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na expressão do gene HSP70. Peixes que receberam β -glucano por 22 dias apresentaram maior expressão do HSP70 quando comparado ao controle aos 22 dias. Não houve diferença nos tratamentos (Figura 10).

Figura 10 - Expressão relativa do gene HSP70 em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon, por RT-PCR.

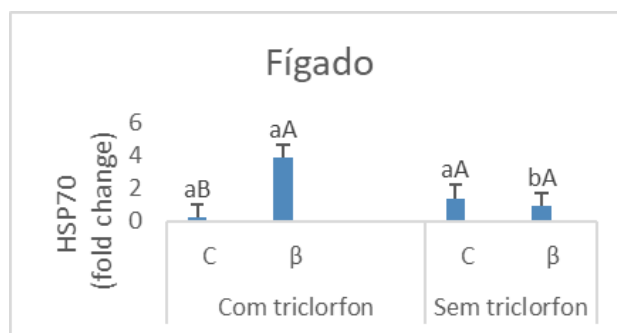


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

Houve diferença significativa na interação dieta x exposição ao triclorfon sobre a expressão do gene HSP70. Peixes que receberam β -glucano e exposição ao triclorfon apresentaram maior expressão do HSP70 quando

comparado ao controle expostos ao praguicida. Já os peixes alimentados com β -glucano não expostos ao triclorfon apresentaram menor expressão que o controle expostos ao praguicida. Os peixes do tratamento controle não expostos ao praguicida, apresentaram maior expressão do HSP70 comparado ao controle exposto ao praguicida (Figura 11).

Figura 11 - Expressão relativa do gene HSP70 em fígado de tilápia alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon, por RT-PCR.



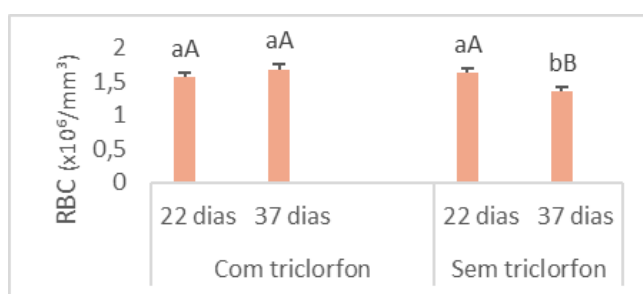
Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro da exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

4.3 Análises Hematológicas

a) RBC($\times 10^6/\text{mm}^3$):

Houve diferença significativa na interação tempo x exposição ao triclorfon sobre o RBC. Peixes expostos ao triclorfon aos 37 dias apresentaram menor RBC quando comparado ao controle não exposto ao praguicida. Já aos peixes alimentados expostos ao triclorfon aos 37 dias, apresentaram maior RBC comparado aos peixes não expostos ao praguicida aos 37 dias. Não houve diferença entre os outros tratamentos (Figura 12).

Figura 12 - RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.

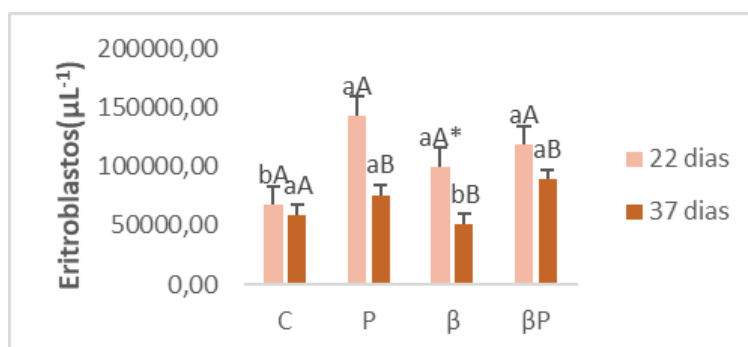


Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon.

b) Eritroblasto (μL^{-1}):

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo x exposição ao triclorfon na concentração de eritroblasto. Os animais submetidos ao β -glucano por 37 dias apresentaram índices mais elevados de eritroblastos em comparação aos animais expostos ao triclorfon. Por outro lado, quando comparados ao período de administração do β -glucano, os animais alimentados por 22 dias e não expostos ao triclorfon exibiram melhores resultados nos índices de eritroblastos. Esse mesmo padrão foi observado nos animais expostos ao triclorfon. Notavelmente, no experimento realizado aos 22 dias, os animais não expostos ao triclorfon, mas alimentados com β -glucano apresentaram índices de eritroblastos superiores aos animais que receberam a dieta controle (livre de β -glucano) (Figura 13).

Figura 13 - Parâmetros de eritroblasto (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.



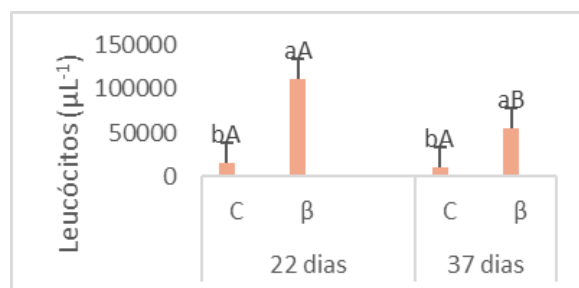
Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam dietas e tempo com exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam tempo e exposição ao triclorfon com dieta. (*) comparam tempo com dieta com exposição. C= dieta controle, P= dieta exposta ao triclorfon, β = dieta β -glucano, βP = dieta β -glucano exposta ao triclorfon.

c) Leucócitos (μL^{-1}):

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na concentração de leucócitos. Em relação aos leucócitos, os animais alimentados com dieta contendo β -glucano aos 22 dias tiveram diferença significativas em comparação aos que receberam a dieta controle (livre de β -glucano), o mesmo ocorreu com os animais aos 37 dias. Notou-se diferença significativa nos

animais alimentados com β -glucano aos 22 dias comparados aos 37 dias (Figura 14).

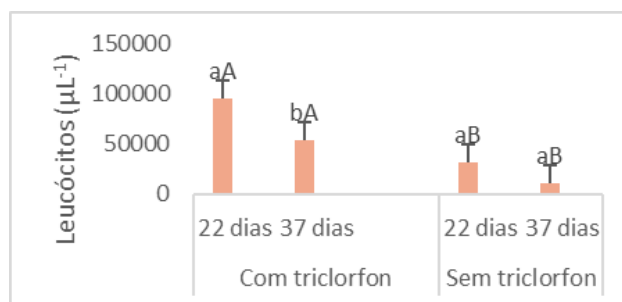
Figura 14 - Parâmetros de leucócito (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano em diferentes tempos.



Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

Houve diferença significativa na interação tempo x exposição ao triclorfon na concentração de leucócitos. Os animais expostos ao triclorfon aos 22 dias apresentaram maiores índices de leucócitos em comparação com os expostos aos 37 dias, e também em relação aos não expostos ao triclorfon (Figura 15).

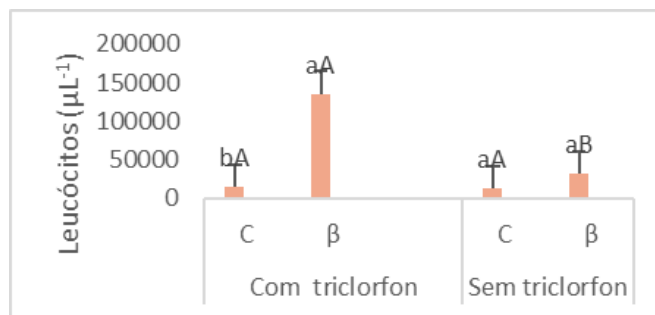
Figura 15 - Parâmetros de leucócito (μL^{-1}) de tilápias alimentadas em diferentes tempos e expostas com triclorfon.



Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon.

Houve diferença significativa na interação dieta x exposição ao triclorfon na concentração de leucócitos. Apresentaram diferenças significativas os animais que foram alimentados com a dieta contendo β -glucano e expostos ao triclorfon, quando comparado a dieta controle (livre de β -glucano). A dieta contendo β -glucano apresentaram maiores índices de leucócito aqueles que foram expostos ao triclorfon (Figura 16).

Figura 16 - Parâmetros de leucócito (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.

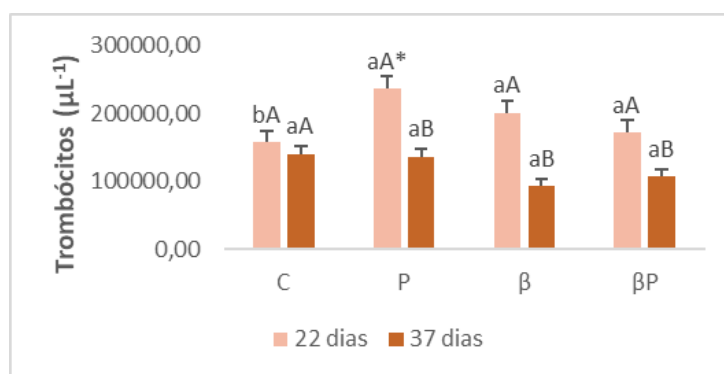


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro da exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

d) Trombócito (μL^{-1}):

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo x exposição ao triclorfon na concentração de trombócitos. Em relação à dieta controle (livre de β -glucano), os animais alimentados por 22 dias apresentaram maiores índices de trombócitos em comparação aos animais expostos ao triclorfon. Os animais que não foram expostos ao triclorfon, mas que receberam a dieta com β -glucano, exibiram índices mais elevados quando alimentados por 22 dias, em comparação aos animais alimentados por 37 dias. Esse mesmo padrão foi observado nos animais expostos ao triclorfon (Figura 17).

Figura 17 - Parâmetros de trombócito (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.

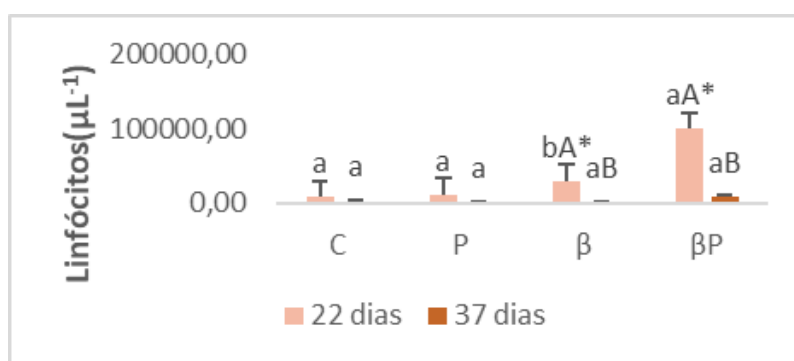


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam tempo e dieta com exposição. Letras maiúsculas comparam tempo e exposição com dieta. (*) comparam tempo com dieta com exposição. C= dieta controle, P= dieta exposta ao triclorfon, β = dieta β -glucano, β P= dieta β -glucano exposta ao triclorfon.

e) Linfócito (μL^{-1}):

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo x exposição ao triclorfon na concentração de linfócitos. Em relação aos animais alimentados com a dieta contendo β -glucano aos 22 dias e expostos ao triclorfon, observou-se maior índice de linfócito em comparação aos animais da mesma dieta que não foram expostos ao triclorfon. Esses mesmos padrões foram verificados nos animais alimentados com a dieta contendo β -glucano aos 37 dias. É relevante mencionar que os animais expostos ao triclorfon aos 22 dias apresentaram índices mais elevados de linfócitos em comparação aos animais que receberam a dieta controle (livre de β -glucano). Essa mesma tendência foi observada nos animais expostos ao triclorfon aos 37 dias (Figura 18).

Figura 18 - Parâmetros de linfócito (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.

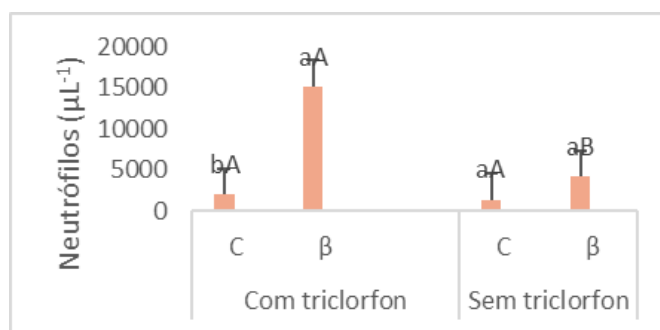


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam tempo e dieta com exposição. Letras maiúsculas comparam tempo e exposição com dieta. (*) comparam tempo com dieta com exposição. C= dieta controle, P= dieta exposta ao triclorfon, β = dieta β -glucano, β P= dieta β -glucano exposta ao triclorfon.

f) Neutrófilos (μL^{-1}):

Houve diferença significativa na interação dieta x exposição ao triclorfon na concentração de neutrófilos. Para os neutrófilos, os animais expostos ao triclorfon e alimentado com β -glucano mostraram maiores índices em comparação à dieta controle (livre de β -glucano). Os animais alimentados com β -glucano e expostos ao triclorfon também apresentaram maiores índices de neutrófilos em comparação com os não expostos ao triclorfon (Figura 19).

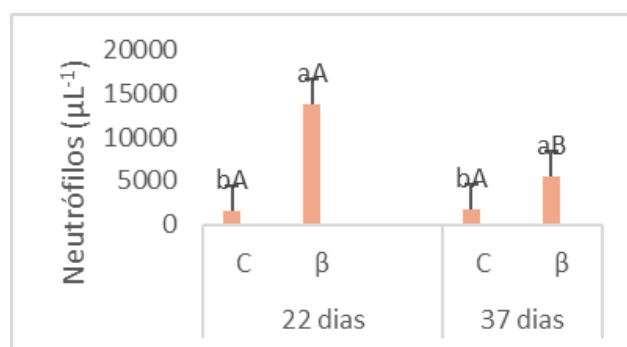
Figura 19 - Parâmetros de neutrófilos (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.



Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na concentração de neutrófilos. Aos 22 dias, os animais alimentados com β -glucano tiveram maiores índices de neutrófilos em comparação aos 37 dias, assim como os animais expostos ao triclorfon em relação aos não expostos (Figura 20).

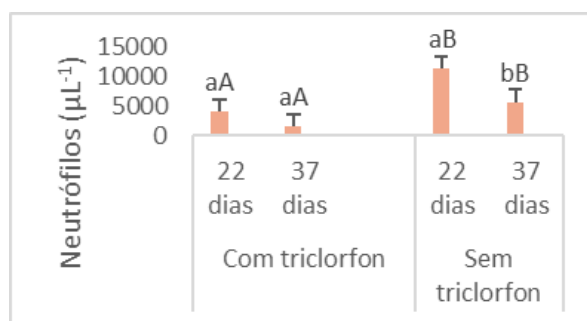
Figura 20 - Parâmetros de neutrófilos (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano em diferentes tempos.



Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano

Houve diferença significativa na interação tempo x exposição ao triclorfon na concentração de neutrófilos (Figura 21).

Figura 21 - Parâmetros de neutrófilos (μL^{-1}) de tilápias alimentadas em diferentes tempos e expostas com triclorfon.

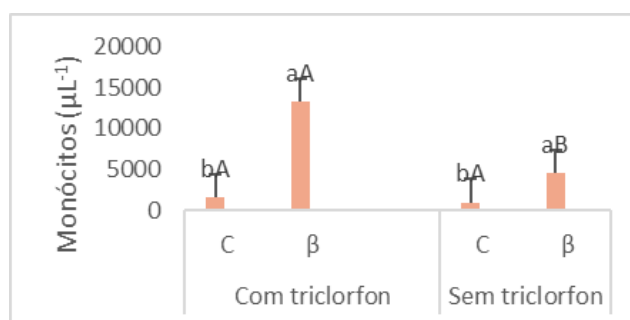


Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam tempo dentro de exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam tempo entre exposição.

g) Monócitos (μL^{-1}):

Houve diferença significativa na interação dieta x exposição ao triclorfon na concentração de monócitos. Animais expostos ao triclorfon apresentaram maiores índices de monócito em relação aos alimentados com β -glucano, assim como os não expostos ao triclorfon. Aos 22 e 37 dias, os animais alimentados com β -glucano e expostos ao triclorfon tiveram maiores índices de monócito do que aqueles que receberam a mesma dieta, mas não foram expostos ao triclorfon (Figura 22).

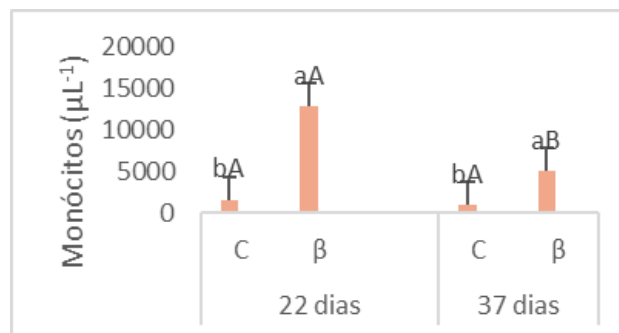
Figura 22. Parâmetros de monócitos (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.



Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na concentração de monócitos. Os índices de monócito para os animais alimentado com β -glucano mostraram diferenças significativas aos 22 e 37 dias de experimentos. Aos 22 dias, os índices de monócito foram maiores em comparação aos 37 dias (Figura 23).

Figura 23. Parâmetros de monócitos (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano em diferentes tempos.

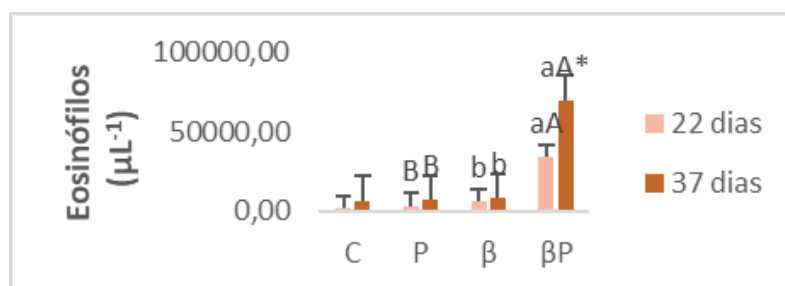


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dias dentro de cada tratamento. Letras maiúsculas comparam tratamentos entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

h) Eosinófilos (μL^{-1}):

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo x exposição ao triclorfon na concentração de eosinófilos. Os animais submetidos à dieta contendo β -glucano aos 22 dias de experimento e expostos ao triclorfon apresentaram índices mais elevados de eosinófilo em comparação aos animais da mesma dieta que não foram expostos ao triclorfon. O mesmo padrão foi observado nos animais alimentados com a dieta contendo β -glucano aos 37 dias de experimento. Além disso, ao comparar os animais que receberam a dieta com β -glucano e que foram expostos ao triclorfon, verificou-se que os animais alimentados aos 37 dias apresentaram índices mais elevados de eosinófilo em relação aos animais alimentados aos 22 dias. É importante destacar que os animais expostos ao triclorfon aos 22 dias exibiram índices mais elevados de eosinófilo em comparação aos que receberam a dieta controle (livre de β -glucano). Esse mesmo padrão foi observado nos animais expostos ao triclorfon aos 37 dias (Figura 24).

Figura 24. Parâmetros de eosinófilos (μL^{-1}) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.

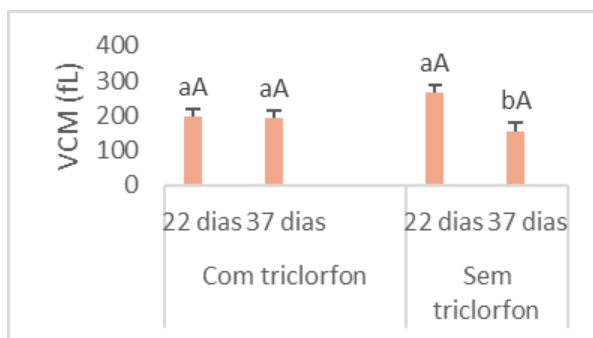


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam tempo e dieta com exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam tempo e exposição com dieta. (*) comparam tempo com dieta com exposição. C= dieta controle, P= dieta exposta ao triclorfon, β = dieta β -glucano, β P= dieta β -glucano exposta ao triclorfon.

i) Índices hematológicos:

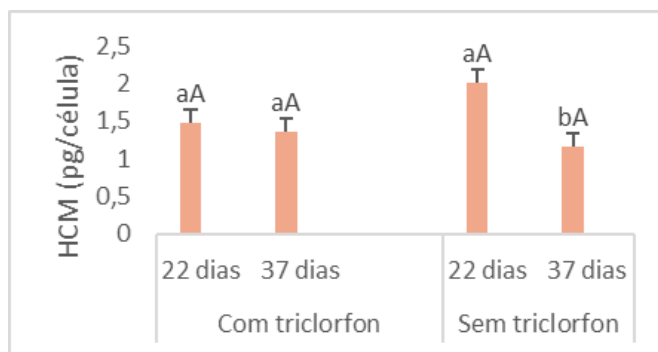
Houve diferença significativa na interação tempo x exposição ao triclorfon no VCM (Figura 25). Houve diferença significativa na interação tempo x exposição ao triclorfon no HCM (Figura 26). Os animais que não foram expostos ao triclorfon, apresentaram diferença significativa para o volume corpuscular médio (VCM) aqueles experimentados aos 22 dias quando comparados aos que foram experimentados aos 37 dias, o mesmo ocorreu para a hemoglobina corpuscular média (HCM).

Figura 25. Parâmetros de VCM (fL) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon



Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. VCM= volume corpuscular médio.

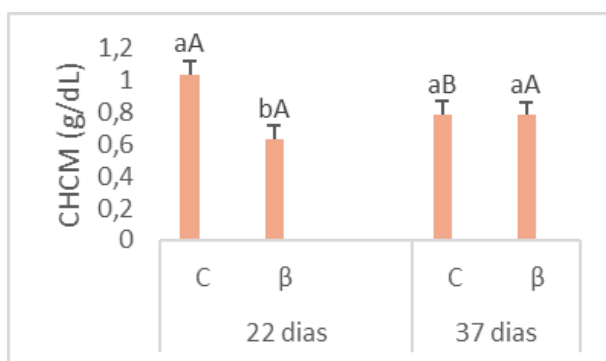
Figura 26. Parâmetros de HCM (pg/célula) de tilápias alimentadas em diferentes tempos e expostas com triclorfon.



Valores são médias $\pm$ erro padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de cada exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. HCM= hemoglobina corpuscular média

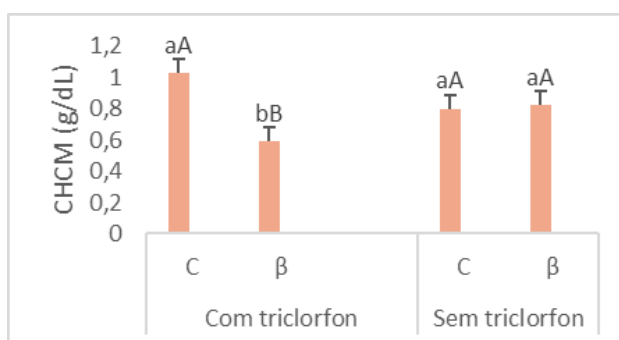
Houve diferença significativa na interação dieta x tempo no CHCM. Houve diferença significativa na interação dieta x exposição ao triclorfon no CHCM. Para a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), os animais alimentados com a dieta contendo β -glucano e não expostos ao triclorfon apresentaram diferença significativa para aqueles que foram expostos e receberam a mesma dieta (Figura 27 e Figura 28).

Figura 27. Parâmetros de CHCM (g/dL) de tilápias alimentadas com β -glucano em diferentes tempos.



Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano, CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média.

Figura 28. Parâmetros de CHCM (g/dL) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.



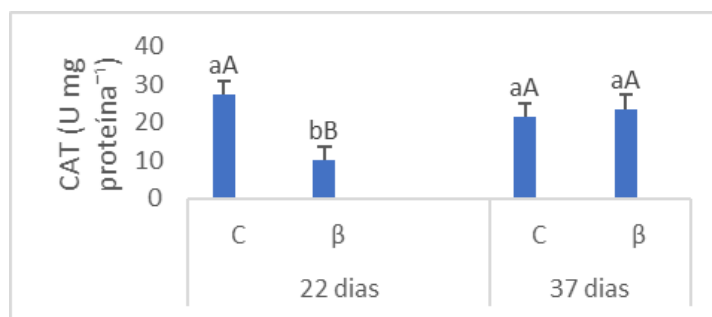
Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas dentro de exposição ao triclorfon. Letras maiúsculas comparam dietas entre exposição ao triclorfon. C= dieta controle, β = dieta β -glucano, CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média.

4.4 Defesa Antioxidante Enzimática

a) Catalase (CAT)

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na atividade da CAT. Peixes que receberam β -glucano por 22 dias apresentaram menor atividade da CAT quando comparado ao controle aos 22 dias. Já aos peixes alimentados com β -glucano por 37 dias apresentaram maior atividade de CAT comparado com os peixes alimentados por 22 dias. Não houve diferença nos demais tratamentos (Figura 29).

Figura 29. Atividade hepática da enzima da catalase (médias $\pm$ EP, n=12) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.

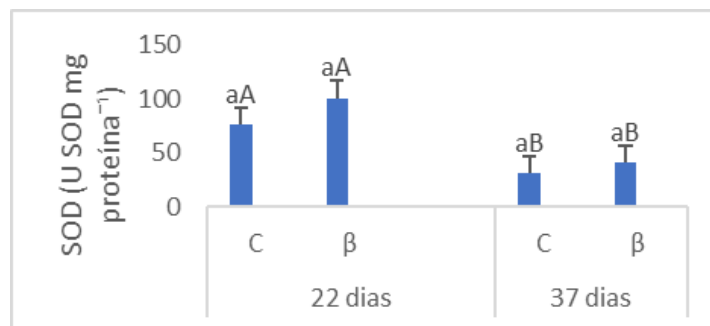


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

b) Superóxido dismutase (SOD)

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na atividade da SOD. Na atividade hepática das enzimas do sistema antioxidante foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para atividade do SOD. O tratamento livre de β -glucano (dieta controle) aos 22 dias apresentou maior atividade hepática quando comparada com o mesmo tratamento 37 dias de experimento. Entretanto, o tratamento com β -glucano aos 22 dias apresentou maior atividade hepática quando comparada ao mesmo tratamento aos 37 dias (Figura 30).

Figura 30. Atividade hepática da enzima da superóxido dismutase (médias $\pm$ EP, n=12) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon

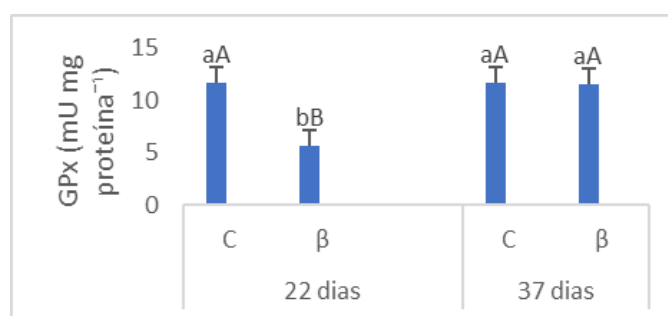


Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

c) Glutathione peroxidase (GPx)

Houve diferença significativa na interação dieta x tempo na atividade da GPx. Na atividade hepática das enzimas do sistema antioxidante foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para atividade da GPx. O tratamento livre de β -glucano (dieta controle) apresentou maior atividade hepática quando comparada com o tratamento β -glucano aos 22 dias de experimento. Entretanto, o tratamento com β -glucano aos 37 dias apresentou maior atividade hepática quando comparada ao mesmo tratamento aos 22 dias (Figura 31).

Figura 31. Atividade hepática da enzima da glutathione peroxidase (médias $\pm$ EP, n=12) de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas com triclorfon.



Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dietas em cada tempo. Letras maiúsculas comparam dietas entre 22 e 37 dias. C= dieta controle, β = dieta β -glucano.

5 DISCUSSÃO

O efeito do imunoestimulante β -glucano em dietas por períodos curtos e/ou em situações de estresse agudo, sendo os peixes desafiados principalmente por bactérias e por ações de manejo tem recebido muita atenção. Nestas pesquisas, as avaliações se baseiam sobretudo na resposta imune, sendo pouco avaliado o desempenho zootécnico e estresse oxidativo (COOK *et al.*, 2003; WHITTINGTON *et al.*, 2005).

Neste estudo, o praguicida triclorfon desencadeou uma conversão alimentar maior que 1 nos animais que receberam a exposição do praguicida no experimento de 37 dias, o que indica que os juvenis de tilápia não estão convertendo a ração consumida para o seu ganho de peso, demonstrando uma baixa eficiência alimentar e otimização dos recursos alimentares. O mesmo ocorreu para o consumo de alimento, indicando que os animais expostos ao praguicida aumentaram a quantidade de ração ingerida. Isso reflete a estreita relação entre o desempenho dos peixes e seu ambiente, por exemplo, a água circundante (EL MEGID *et al.*, 2020).

A alta contaminação por clorpirifós (praguicida organofosforado), por exemplo, pode perturbar o comportamento e a fisiologia associada da tilápia-do-Nilo (IBRAHIM *et al.*, 2019). No entanto, o uso de alimentação aquática funcional provavelmente melhora o desempenho dos peixes e reduz os impactos negativos de tóxicos transmitidos pela água (DAWOOD *et al.*, 2020a). Ao mesmo tempo, a administração dietética de β -glucana independentemente de fontes suplementares (levedura, cogumelo, bactérias) e níveis de inclusão (0,01–0,8%) não exibiu influências benéficas no desempenho de crescimento e eficiência alimentar da tilápia do Nilo (WHITTINGTON *et al.*, 2005; SHELBY *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2015; YAMAMOTO *et al.* 2018; LU *et al.*, 2019; DAWOOD *et al.*, 2020c; XU *et al.*, 2020; KOCH *et al.*, 2021).

Ressalta-se, também, que o protocolo de suplementação (período de administração, forma e a concentração do imunoestimulante) possui influência nas respostas, tornando os resultados por vezes contraditórios. Gannam e Schrock (2001) destacaram ainda a importância da estrutura do glucano para sua atividade. Por essas razões, o produto e sua atividade devem ser avaliados cuidadosamente, pois comparações tornam-se difíceis quando da utilização de produtos comerciais.

A avaliação da função oxidativa é uma importante ferramenta para monitorar o bem-estar de espécies aquáticas sob condições estressantes (DAWOOD *et al.*, 2019). O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de radicais livres (ROS) e o sistema de defesa antioxidante protetor em organismos vivos, especialmente durante situações de toxicidade (TELLEZ-BAÑUELOS *et al.*, 2009). Biller *et al.*, (2013) destacaram que a presença de um processo inflamatório aumenta a geração de radicais livres (RLs) e, conseqüentemente, a produção de compostos antioxidantes. Durante a fagocitose de patógenos, os leucócitos aumentam o consumo de oxigênio intracelular, resultando na produção de diversas espécies reativas de oxigênio (EROs), que também são radicais livres (RLs). Um indicador de estresse oxidativo ocorre quando os radicais livres levam elétrons do lipídio a membrana celular, resultando em dano celular. Em nosso experimento, a expressão relativa de CAT não apresentou diferença significativa no fígado de tilápias. Assim, o uso do β -glucano, apesar de modular o sistema de defesa não aumenta a demanda desse antioxidante, indicando que é seguro e eficiente em peixes. Resultados similares foram encontrados em peixes alimentados com β -glucano (EL-MURR *et al.*, 2019; JI *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2009). Os praguicidas podem aumentar a formação de ROS e alterar os sistemas enzimáticos antioxidantes ou de eliminação de radicais livres (YONAR *et al.*, 2015; YONAR *et al.*, 2020).

A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) é amplamente conhecida e considerada a primeira linha de defesa contra os radicais livres (RLs). A SOD catalisa a transformação de radicais superóxido em H_2O_2 e O_2 . Neste estudo, a expressão relativa do gene SOD no fígado foi maior nos animais alimentados com β -glucano aos 37 dias de experimento, corroborando os achados de Hai *et al.* (1997), que relataram um aumento significativo na atividade de SOD em bagres de água doce (*Ictalurus nebulosus*) expostos a diclorvos. Curiosamente, os animais que receberam a dieta controle (livre de β -glucano) e que foram expostos ao triclorfon apresentaram menor expressão relativa do gene SOD. A SOD é uma enzima que previne o acúmulo intracelulares de RLs (HALLIWELL *et al.*, 1995; PIETTA, 2000) e é caracterizada como primeira linha de defesa contra os danos oxidativos (ATLI; CANLI, 2010).

O sistema de defesa antioxidante atua na prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O mecanismo de defesa antioxidante é conhecido, onde o antioxidante não enzimático GSH (glutathiona) desempenha um papel fundamental na proteção das células contra o estresse oxidativo (WILHELM, 1996; ALDRIGE, 1981). O GSH atua como substrato para as enzimas GPx e GST, as quais estão envolvidas em diversas reações de desintoxicação de ROS (radicais livres de oxigênio). A GR é essencial na regeneração do GSH reduzido da sua forma oxidada (GSSG ou dissulfeto de GSH), mantendo o nível intracelular de GSH elevado (RANA *et al.*, 2002).

Além disso, a catalase atua catalisando a decomposição de H_2O_2 em água e oxigênio, enquanto a glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidroperóxido usando GSH como substrato (FLOHE, 1989; URSIM *et al.*, 1995). Portanto, esses antioxidantes inibem a formação de radicais hidroxila e protegem os componentes celulares contra danos oxidativos (DEEPAK *et al.*, 2007). Desta forma, avaliando-se a expressão do gene GPx, nota-se que os animais que foram alimentados com o β -glucano e não foram submetidos a exposição ao triclorfon apresentaram menor expressão do gene. Apesar da enzima GPx ter ação moderada no fígado em situações que acionam o estresse oxidativo comparado ao rim e ao baço (CUNHA *et al.*, 2017), esses resultados são consistentes com os achados de Kozar *et al.*, (2003), que observaram uma diminuição significativa dos níveis de GSH devido ao metabolismo de AFB1 (aflatoxina B1), possivelmente relacionado ao consumo de GPx e GR, que tem associação direta com o GSH.

As enzimas glutathiona dependentes e associadas, como a glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-S-transferase (GST) e glutathiona redutase (GR), parecem desempenhar um papel mais relevante no combate ao estresse oxidativo sazonal do que as enzimas antioxidantes primárias, superóxido dismutase (SOD) e catalase (BAGNYUKOVA *et al.*, 2007). A GPx catalisa a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e hidroperóxidos, convertendo o GSH em GSSH. Neste estudo, tanto os animais experimentados aos 22 dias quanto o grupo exposto ao triclorfon apresentaram maior expressão do gene GR os animais que receberam a dieta com β -glucano. Esse aumento no nível de GSH pode ter sido resultado dos efeitos protetores de β -glucano na unidade sulfidrila de GSH (LEI *et al.*, 2015). Por outro lado, a

expressão do gene da glutathione-S-transferase (GST), uma enzima de desintoxicação de fase II, não apresentou diferenças significativas nos animais alimentados com β -glucano ou expostos ao triclorfon, conforme constatado neste estudo.

A HSP70 hepática é responsável por manter a integridade celular em peixes submetidos a estresse tóxico (MING *et al.*, 2010; LINDQUIST; CRAIG 1988; FORSYTH *et al.*, 1997). Os resultados atuais demonstram que os animais que receberam a dieta com β -glucano apresentaram maior expressão do gene HSP70 no fígado aos 22 dias de experimento. Essa resposta elevada de HSP70 sugere que a dieta com β -glucano, combinada com a exposição ao triclorfon, induz proteotoxicidade em tilápias-do-Nilo. Os peixes enfrentam a proteotoxicidade induzindo HSPs, que têm a capacidade de reparar proteínas parcialmente desnaturadas (HALLARE *et al.*, 2004). Estressores, como substâncias tóxicas, podem induzir a HSP70, e essa indução tem sido usada como um biomarcador geral de estresse tóxico (HASSANEIN *et al.*, 1999, VARÓ *et al.*, 2002, DE BOECK *et al.*, 2003). O grupo não exposto ao triclorfon apresentou uma expressão consideravelmente mais baixa de HSP70 no fígado, o que confirma o papel do β -glucano no equilíbrio da expressão de HSP70 em tilápias-do-Nilo.

Neste estudo, avaliamos o impacto da suplementação dietética com β -glucano no sistema imunológico da tilápia, comparando com os animais que receberam a dieta controle (livre de β -glucano) e os expostos ao triclorfon. Observamos que os animais alimentados com β -glucano apresentaram significativa melhora nos parâmetros imunológicos, mesmo na ausência de exposição ao triclorfon. As imunidades inata e adquirida, compostas por componentes celulares e humorais, são ativados por doenças, imunização ou administração de imunoestimulantes (SAKAI, 1999). Os parâmetros hematológicos são indicativos do estado fisiológico e da saúde dos peixes (DAWOOD *et al.*, 2020c). Os leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos, desempenham um papel crucial na fagocitose de bactérias e na defesa contra doenças (BARROS *et al.*, 2014).

A suplementação com β -glucano levou ao aumento dos níveis de eritroblasto e glóbulos vermelhos (RBC, leucócito e trombócito) na tilápia, desempenhando um papel protetor nesta espécie. Corroborando esses

achados, Biller-Takahashi *et al.*, (2015) relataram que a suplementação dietética para 0,6 mg Se- levedura kg⁻¹ aumentou os níveis de hemácias, trombócitos e leucócitos em pacu. Além disso, estudos semelhantes, mostraram que a alimentação de peixes com β -glucano resultou níveis ótimos de creatinina e uréia, sugerindo sua função protetora contra danos hepatorreais induzidos por clorpirifós (DAWOOD *et al.*, 2020).

Neste estudo, a inclusão de β -glucano na dieta melhorou a contagem de leucócitos, incluindo os linfócitos, neutrófilo, monócito e o eosinófilo e promoveu o aumento dos níveis de hemoglobina em tilápias. Estudos anteriores com peixes como o pompano (*Trachinotus ovatus*) mostraram melhorias na contagem de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, linfócitos e monócitos com diferentes níveis de β -glucano na dieta (DO HUU *et al.*, 2016). Além disso, a inclusão de 0,1-0,2% de β -glucano na dieta aumentou a contagem de leucócitos e/ou os níveis de hemoglobina em tilápias (ABDELHAMID *et al.*, 2020, DAWOOD *et al.*, 2020b, DAWOOD *et al.*, 2020c, DAWOOD *et al.*, 2020d, DAWOOD *et al.*, 2020f).). Esses resultados indicam que a adição de β -glucano na dieta favorece a saúde dos peixes.

A exposição ao triclorfon e o estresse decorrente de baixas temperaturas resultam na desestabilização da homeostase celular, ocasionada pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas ROS causam danos as membranas, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando a alterações estruturais e perda da homeostase celular (FREI,1994). Organismos aeróbicos, como os peixes, sintetizam diversas enzimas antioxidantes e outras proteínas com o propósito de mitigar o dano oxidativo (FRIDOVICH, 1995). Enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx), têm a função de eliminar ou neutralizar ROS (DAWOOD *et al.*, 2019; MOUSTAFA *et al.*, 2019). Assim, essas enzimas desempenham funções cruciais como antioxidantes e agentes desintoxicantes, garantindo a preservação da integridade do sistema de defesa dos organismos frente à exposição aos agrotóxicos (SANTANA *et al.*, 2018).

Neste estudo, os animais que receberam a dieta com β -glucano apresentaram menor atividade hepática da enzima CAT em relação aos animais que receberam a dieta controle aos 22 dias. No entanto, aos 37 dias, a dieta contendo β -glucano demonstrou maior atividade hepática da CAT em

comparação com os resultados obtidos aos 22 dias. Quanto à atividade hepática da enzima GPx, os animais que receberam a dieta com β -glucano aos 37 dias apresentaram maior atividade hepática do que aqueles alimentados com a mesma dieta aos 22 dias. Por sua vez, em relação à atividade hepática da enzima SOD, os animais que receberam a dieta contendo β -glucano aos 22 dias apresentaram maior atividade hepática do que os animais alimentados aos 37 dias. Essas descobertas foram corroboradas por estudos anteriores que registraram a regulação positiva das atividades séricas de SOD, CAT e GPx (LU *et al.*, 2019, DAWOOD *et al.*, 2020b, DAWOOD *et al.*, 2020c). Resultados semelhantes foram observados, indicando que a suplementação dietética com 0,1–0,15% de β -glucano aumentou as atividades de SOD no fígado e baço, enquanto reduziu o conteúdo de MDA no fígado ou baço de tilápias-do-Nilo (LU *et al.*, 2019, ABDELHAMID *et al.*, 2020). Esses resultados sugerem que o uso do β -glucano na dieta pode atuar na eliminação de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica e prevenção de danos causados por H_2O_2 e ROS, melhorando as atividades das enzimas antioxidantes.

6 CONCLUSÃO

Os resultados revelaram alterações no estado oxidativo e imunossupressão no fígado da tilápia-do-Nilo. A inclusão de β -glucano na dieta teve um papel imunomodulador na tilápia, influenciando diretamente o equilíbrio do sistema antioxidante e as defesas imunes desses peixes. O β -glucano regulou diferentes vias metabólicas, o que possivelmente reduziu o impacto do triclorfon no desempenho da tilápia e aliviou a sobrecarga do sistema de defesa antioxidante na eliminação de espécies reativas de oxigênio.

7 REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. Academic Press. V. 105, p. 121 –126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3). (1984).

ABDELHAMID, F.M.; ELSHOPAKEY, G.E.; AZIZA, A.E.. Ameliorative effects of dietary *Chlorella vulgaris* and β -glucan against diazinon-induced toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish. Shellfish Immunol.**, v. 96, pp. 213-222, 10.1016/j.fsi.2019.12.009. (2020).

ALCORN, S. W.; PASCHO, R. J.; MURRAY, A. L.; SHEARER, K. D. Effects of ration level on immune function in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Oxford, v. 217, p. 529-545, 2003.

ALDRIGE, W.N. Mechanism of toxicity – new concepts are needed in toxicology. **Trends Pharmacol. Science**, v. 2, pp. 228-231, (1981).

AL-KAHEM, H. F.; AHMED, Z.; Al-Akel, A. S.; SHAMSI, M. J. K.. Toxicity bioassay and changes in haematological parameters of *Oreochromis niloticus* induced by trichlorfon. **Arab Gulf Journal of Scientific Research** 16 (1998): 581-593.

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** 73:1884–1889.

BAGNYUKOVA, T.V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I.. Oxidative stress and antioxidant defense responses of goldfish tissues to an acute temperature change from 3 to 23 °C. **J. Therm. Biol.**, 32 (2007), pp. 227 - 234, 10.1016/j.jtherbio.2007.01.004

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M.. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2008.

BARROS, M.M.; FALCON, D.R.; ORSI, R.O.; PEZZATO, L.E; FERNANDES, A.C.; GUIMARÃES, I.G.; FERNANDES, A.; PADOVANI, C.R. ; SARTORI, M.M.P.. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress

and bacterial challenge. **Fish. Shellfish Immunol.**, 39 (2014), pp. 188-195, 10.1016/j.fsi.2014.05.004.

BARROS, M.M.; FALCON, D.R.; ORSI, R.O.; PEZZATO, L.E; FERNANDES, A.C.; FERNANDES, A.; CARVALHO, P. L. P. F.; PADOVANI, C. R.; GUIMARÃES, I.G.; SARTORI, M.M.P.. Immunomodulatory effects of dietary β -glucan and vitamin C in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., subjected to cold-induced stress or bacterial challenge. **J. World Aquac. Society**, 46 (2015), pp. 363 - 380, 10.1111/jwas.12202

BILLER-TAKAHASHI, J.D., TAKAHASHI, L.S., SAITA, M.V., GIMBO, R.Y., URBIMATI, E.C. 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Braz. J. Biol.** 73, 425-429.

BIKKER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MINGATTO, F. E.; URBINATI, E. C.. The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*, **Fish & Shellfish Immunology**, Volume 47, Issue 1, 2015, p. 360-367, ISSN 1050-4648, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.022>.

BLAZER, V. S. Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 77-86, 1991.

BRANDAL, PO.; EGIDIUS, E. Treatment of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer, 1838) with Neguvon® - description of method and equipment. **Aquaculture**, 18 (1979), pp. 183 – 188.

CEROZI, B. S. **Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. Administration of a commercial immunostimulant preparation Ecoactiva as a feed supplement enhances macrophase respiratory burst and the growth rate

of snapper (*Pagrus auratus*, *Sparidae* (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish Shellfish Immunol.**, v.14, n.4, p.333-345, 2003.

COPPAGE, DL.; MATTHEWS, E. Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterases of estuarine fish and pink shrimps. **Bull. Environment. Count. Toxic.**, 11 (1974), pp. 483-488.

CUNHA, M. A.; ZEPPENFELD, C. C.; GARCIA, L. O.; LORO, V. L.; FONSECA, M. B.; EMANUELLI, T.; VEECK, A. P. L.; COPATTI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural.**, 40 (2010), pp. 2107-2114

DAWOOD, M.A.O.; ABDEL-TAEEAB, M.; ABDEL-LATIF, H. M. R.. Lycopene reduces the impacts of aquatic environmental pollutants and physical stressors on fish. **Rev. Aquac.** (2020),10.1111/raq.12455

DAWOOD, M.A.O.; ZOMMARA, M.; EWWWDAH, N. M.; HELAL, A.. Synergistic effects of selenium and vitamin E nanoparticles on growth, immune-related gene expression and regulation of antioxidant status in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), **Biological trace element research.** (2019)

DAWOOD, M.A.O.; ABDO, S.E.; GEWAILY, M. S.; MOUSTAFA, E. M.; SAADALLAH, M. S.; ABDEL-KADER, M. F.; HAMOUDA, A. H.; OMAR, A.A.; ALWAKEEL, R. A.. The influence of dietary β -glucan on immune, transcriptomic, inflammatory and histopathology disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish. Shellfish Immunol.**, 98 (2020b), pp. 301-311, 10.1016/j.fsi.2020.01.035

DAWOOD, M.A.O.; EWWWDAH, N. M.; MOUSTAFA, E. M.; SHAHIN, M. G.. Synergistic effects of *Aspergillus oryzae* and β -glucan on the growth and oxidative and immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Antimicro probiotics. Protection**, 12 (2020c), pp. 389 - 399,10.1007/s12602-018-9513-9.

DAWOOD, M. A. O.; METWALLY, A. E. -S.; EL-SHARAWY, M. E.; ATTA, A. M.; ELBIALY, Z. I.; ABDEL-LATIF, H. M. R.; PARAY, B. A.. The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock

protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. **Aquaculture**, 523 (2020d), Article 735205, 10.1016/j.aquaculture.2020.735205.

DAWOOD, M.A.O.; MAGOUZ, F. I.; SALEM, M. F. I.; ELBIALY, Z. I.; ABDEL-DAIM, H. A. Synergetic effects of *Lactobacillus plantarum* and beta-glucan on digestive enzyme activity, intestinal morphology, growth, fatty acid, and glucose-related gene expression of genetically improved farmed tilapia. **Probiotics Antimicro. Prot.**, 12 (2020f), pp. 389-399, 10.1007/s12602-019-09552-7.

DE BOECK, G.; DE WACHTER, B.; VLAEMINCK, A.; BLUST, R. Effect of cortisol treatment and/or sublethal copper exposure on copper uptake and heat shock protein levels in common carp, *Cyprinus carpio*. **Environ. Toxicol. Chem.**, 22 (2003), pp. 1122-1126.

DEEPAK, K.D; VEERENDRA, C.Y; SIVA, S.N.; TIRTHA, G.; RAJALINGAM, D.; PINAKI, S. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) RBr on paracetamolinduced hepatotoxicity in rats. **Trop. J. Pharm. Res.**, 6 (2007), pp. 755-765.

DO HUU, H.; SANG, H. M.; THANH THUY, N. T.. Dietary β -glucan improved growth performance, *Vibrio counts*, haematological parameters and stress resistance of pompano fish, *Trachinotus ovatus Linnaeus*, 1758. **Fish. Shellfish Immunol.**, 54 (2016), pp. 402-410, 10.1016/j.fsi.2016.03.161.

EL-MEGID, A. A.; ABD AL FATAH, M. E.; EL ASELY, A.; EL SENOSI, Y.; MOUSTAFA, M. M. A.; DAWOOD, M. A. O.. Impact of pyrethroid and organochlorine pesticide residues on IGF-1 and CYP1A gene expression and on muscle protein patterns of Mugil captive cultured. **Ecotoxicol. Environment. safe**, 188 (2020), Artigo 109.876.

EL-MURR, A.; EL HAKIM, Y. A.; NEAMAT-ALLAH, A. N. F.; BAESHEN, M.; ALI, H.. Immunoprotective, antioxidant and relative gene expression impacts of β -glucan against fipronil toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Seafood Immunol.**, 94 (2019), pp. 427-433.

FLOHE, L. 1989. The selenoprotein glutathione peroxidase. D. Dolphin, O. Avramovie, **R. Poulson (Eds.)**, Glutathione: Chemical Biochemical and Medical Aspects. Part A, John Wiley & Sons, New York (1989), p. 643.

FORSYTH, R. B.; CANDIDO, E. P. M.; BABICH, S. L.; IWAMA, G. K. Stress protein expression in *Coho salmon* with bacterial kidney disease. **J. Aquat. Anim. Health**, 9 (1) (1997), pp. 18-25.

GANNAM, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in fish diets. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Nutrition and fish health**. New York: Haworth Press, 2001. p.235-260.

HAJ, D. Q.; VARGA, S. I.; MATKOVICS, B. I. Effects of organophosphates on the antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). **Comp. Bioquim. Physiol. C. Pharmacol. Tóxico. Endocrinol.**, 117 (1997), pp. 83 - 88, 10.1016/S0742-8413(96)00234-4.

HALLARE, A.V.; KOHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Development toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvents, DMSO. **Chemosphere**, 56 (2004), pp. 659-666.

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

IBRAHIM, R.E.; EL-HOUSEINY, W.; BEHAIRY, A.; MANSOUR, M. F.; ABD-ELHAKIM, Y. M.. Enhancing effects of *Moringa oleifera* seeds and leaves on chlorpyrifos-induced growth retardation, immune suppression, oxidative stress and DNA damage in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, 505 (2019), pp. 225 – 234.

JI, L.; SUN, G.; Li, J.; Wang, Y.; DU, Y.; LI, X.; LIU, Y.. Effect of dietary β -glucan on growth, survival and regulation of immune processes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*. **Fish Seafood Immunol.**, 64 (2017), pp. 56 – 67.

KIM, Y.-s.; KE, F.; Zhang, Q-Y. Effect of β -glucan on antioxidant enzyme activity and Mx gene expression in virus-infected grass carp. **Fish Seafood Immunol.**, 27 (2) (2009), pp. 336 – 340.

KOCH, J. F. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the period of administration. **Fish. Seafood Immunol.**, 112 (2021), pp. 56-63, 10.1016/j.fsi.2021.02.014.

KOZER, E.; EVANS, S.; BARR, J.; GREENBERG, R.; SORIANO, I.; BULKOWSTEIN, M.; PETROV, I.; CHEN-LEVI, Z.; BARZILAY, B.; BERKOVITCH, M.. Glutathione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in erythrocytes from children treated with high-dose paracetamol. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 55 (2003), pp. 234-240.

LALL, S. P. Nutrition and health of fish. In: **SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA**, 5., 2000, Mérida. Avances em nutrición acuícola: Memórias... Mérida, 2000, p. 13-23. 1 CD-ROM.

LANDOLT, M. L. The relationship between diet and the immune response of fish. **Aquaculture**, v. 79, p. 193-206, 1989.

LEI, N.; WANG, M.; ZHANG, L.; XIAO, S.; FEI, C.; WANG, X.; ZHANG, K.; ZHENG, W.; WANG, C.; YANG, R.; XUE, F.. Effects of low molecular weight yeast β -glucan on antioxidant and immunological activities in mice. **Int. J. Mol. Sci.**, 16 (9) (2015), pp. 21575-21590.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, 22 (1) (1988), pp. 631-677.

LU, D.-L.; LIMBU, S. M.; LV, H.-B.; MA, Q.; CHEN, L.-Q.; ZHANG, M.-L.; DU, Z.-Y.. Comparisons of protective mechanisms and efficiencies between dietary α -lipoic acid, β -glucan and L-carnitine in Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. **Fish. Seafood Immunol.**, 86 (2019), pp. 785-793, 10.1016/j.fsi.2018.12.023.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. Influence of diet processing form on performance and survival of Nile tilapia during sex revert phase. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 32, n. 2, p. 1516-3598. 2003.

MING, J.; XIE, J.; XU, P.; LIU, W.; GE, X.; LIU, B.; HE, Y.; CHENG, Y.; ZHOU, Q.; PAN, L. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). **Fish Shellfish Immunol.**, 28 (3) (2010), pp. 407-418.

MOUSTAFA, E. M.; DAWOOD, M. A. O.; ASSAR, D. H; OMAR, A. A.; ELBIALY, Z. I.; FARRAG, F. A.; SHUKRY, M.; ZAYED, M. M.. Modulatory effects of fenugreek seed powder on histopathology, oxidative status and immune-related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Aquacultura** (2019), p. 734589.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-2, 2002.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; HIDALGO, M.C.; MORALES, A.E.; ARIZCUN, M.; ABELLÁN, E.; CARDENETE, G. (2009). Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in Dentex dentex fed on different dietary macronutrient levels. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, 150, 537-545.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time qPCR-RT. **Nucleic Acids Res.**, vol.29, n.9, p.2002-2007, 2004.

PIETTA, P.; Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products** - J Nat Prod, vol. 63, no. 7, pp. 1035-1042, 2000.

PINHEIRO, L.M.S.; PINHEIRO, L.E.L.; MARTINS, R.T. Aspectos técnicos da tilapicultura. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, n. 50, p. 75-80, 2006.

QIN, JG.; DONG, P. Acute toxicity of triclofon to juvenile yabby *Cherax destructor* (Clark) and selected zooplankton species. **Aquac. Res.**, 35 (2004), pp. 1104 – 1107.

RANA, S.V.S.; ALLEN, T.; SINGH, R. Inevitable glutathione, then and now. **Indian J. Exp. Biol.**, 40 (2002), pp. 706-716.

REBOUÇAS, E. M. *et al.* Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Engineering, Technology, and Techniques**, Curitiba, vol. 56, n. 1, p.31 2013.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, 172 (1999), pp. 63-92.

SAMUELSEN, O. Effects of aecization rate, pH and temperature on triclorfom degradation in DDVP and triclorfom and DDVP half-lives in seawater. **Aquaculture**, 66 (1987), pp. 373 – 380.

SANTANA, M.S.; YAMAMOTO, F. Y.; SANDRINI-NETO, L.; FILIPAK-NETO, F.; ORTOLANI-MACHADO, C.F.; RIBEIRO, C. A. O.; PRODOCIMO, M.M.. Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 149 (2018), pp. 173-181, 10.1016/j.ecoenv.2017.11.036

SHELBY, R.A.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; WELKER, T. L.; KLESIUS, P. H.. Effects of yeast oligosaccharide dietary supplements on growth and disease resistance in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J. Appl. Aquac.**, 21 (2009), pp. 61 - 71, 10.1080/10454430802694728.

SITJA-BOBADILLA, A.; PEREZ-SANCHEZ, J. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 637-640, 1999.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 71-90, 2003.

STOSKOPF, M. Anaesthesia. In: Brown, L. (ed.). *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. **Pergamon Veterinary Handbook Series**, London, p. 161- 168, 1993.

TELLEZ-BAÑUELOS, M.C.; SANTERRE, A.; CASAS-SOLIS, J.; BRAVO, CUELLAR, A.; ZAITSEVA, G.. Oxidative stress in spleen macrophages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. **Fish Seafood Immunol.**, 27 (2) (2009), pp. 105 – 111.

URSIM, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHE, R. The diversity of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, 252 (1995), p. 380.

VARÓ, I.; SERRANO, R.; PITARCH, E.; AMAT, F.; LÓPEZ, F.J.; NAVARRO, J.C. Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food Chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 42 (2002), pp. 229-235.

WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIOUS, P.H. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, **Aquaculture**, 248 (2005), pp. 217 - 225, 10.1016/j.aquaculture.2005.04.013.

WILHELM, D. Fish antioxidant defenses—a comparative approach. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 29 (1996), pp. 1735-1742.

WOLTERING, DM. Growth response in chronic and early toxicity tests in fish: a critical review. **Aquat. Toxic.**, 5 (1984), pp. 1-21.

WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish disease and Disorders**, v. 3, p. 626 – 633, 1998.

WOO, S.J.; CHUNG, K. J.. Effects of trichlorfon on oxidative stress, neurotoxicity, and cortisol levels in common carp, *Cyprinus carpio* L., at different temperatures, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 229, 2020, 108698, ISSN 1532-0456, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108698>.

XU, C.; SUO, Y.; WANG, X.; QIN, J. G.; CHEN, L.; LI, E. Recovery from hypersaline stress-induced immunity damage and intestinal microbiota alterations through dietary β -glucan supplementation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Animals**, 10 (2020), p. 2243, 10.3390/ani10122243.

YAMAMOTO, F.Y.; SUTILI, F. J.; HUME, M.; GATLIN, D. M. III. The effect of β -1,3-glucan derived from *Euglena gracilis* (Algamune™) on innate immune responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **J. Fish. Dis.**, 41 (2018), pp. 1579-1588,10.1111/jfd.12871.

YONAR, M.E.; YONAR, S.M.; PALA, A.; SILICI, S.; SAGLAM, N. Hematological and biochemical changes induced by trichlorfon in *Cyprinus carpio*: improving effect of propolis. **Dis. Aquat. Org.**, 114 (2015), pp. 209-216,10.3354/dao02866.

YONAR, ME.; YONAR, SM.; PALA, A.; SILICI, S., SAGLAM, N. Hematological and biochemical changes induced by trichlorfon in *Cyprinus carpio*: improving effect of propolis. **Dis. Aquat. Org.**, 114 (2015), pp. 209-216,10.3354/dao02866.

YONAR, S.M.; YONAR, M.E.; PALA, A.; SAGLAM, N.; SAKIN, F. Effect of trichlorfon on some hematological and biochemical changes in *Cyprinus carpio*: the enhancing effect of lycopene. **Aquacult. Rep.**, 16 (2020), p. 100246

YONAR, S. M.; YONAR, M. E.; PALA, A.; SAGLAM, N.; SAKIN, F. Effect of trichlorfon on some hematological and biochemical changes in *Cyprinus carpio*: the enhancing effect of lycopene. **Aquacult. Rep.**, 16 (2020), p. 100246,10.1016/j.aqrep.2019.100246.

ZHANG, X. P.; LI, W. X.; AI, T. S.; ZOU, H.; WU, S. G.; WANG, G. T. The effectiveness of four common anthelmintic drugs and extracts from traditional Chinese medicinal plants to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). **Aquicultura**, 420 (2014), pp. 302 – 307.