

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/01/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ESTUDO DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR
Flavobacterium oreochromis EM PACU (*Piaractus
mesopotamicus*) ALIMENTADO COM RAÇÃO
COMERCIAL SUPLEMENTADA COM EXTRATO DE
*Ulva lactuca***

André do Vale Oliveira

Jaboticabal, SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ESTUDO DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR
Flavobacterium oreochromis EM PACU (*Piaractus
mesopotamicus*) ALIMENTADO COM RAÇÃO
COMERCIAL SUPLEMENTADA COM EXTRATO DE
*Ulva lactuca***

André do Vale Oliveira

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

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

Jaboticabal, SP

2023

O	
L	
I	
V	
E	
I	
R	
A	
A.	
V.	
2	
0	
2	
3	

Oliveira, André do Vale
O48e Estudo da inflamação induzida por *Flavobacterium oreochromis* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração comercial suplementada com extrato de *Ulva lactuca* / André do Vale Oliveira. -- Jaboticabal, 2023
vi, 58 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2023
Orientadora: Fabiana Pikarski
Banca examinadora: Levi Pompermayer Machado, Róberson Sakabe
Bibliografia

1. Alga. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Columnariose. 4. Inflamação. 5. Pacu. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da inflamação e resposta imune induzida por *Flavobacterium columnare* em pacus (*Piaractus mesopotamicus*), alimentados com dieta suplementada com extrato de *Ulva lactuca*

AUTOR: ANDRÉ DO VALE OLIVEIRA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Prof. Dr. RÓBERSON SAKABE (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Agrossocioambiental Sustentável / Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. LEVI POMPERMAYER MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro



Documento assinado digitalmente

LEVI POMPERMAYER MACHADO
Data: 10/10/2023 15:23:40-0300
Verifique em <https://validar.rti.gov.br>

Jaboticabal, 23 de janeiro de 2023

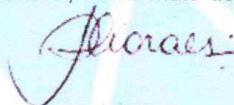
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da inflamação induzida por *Flavobacterium columnare* em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), alimentados com dieta suplementada com extrato de *Ulva lactuca* e nucleotídeo**", protocolo nº 1172/21, sob a responsabilidade da Profª Drª Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de maio de 2021.

Vigência do Projeto	30/05/2021 a 30/07/2021
Espécie / Linhagem	PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)
Nº de animais	384
Peso / Idade	40-60g
Sexo	Indefinido
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 13 de maio de 2021.



Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Vice- Coordenadora – CEUA

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	1
APOIO FINANCEIRO	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1.1 Produção de peixes no Brasil.....	6
1.2 <i>Flavobacterium oreochromis</i> na piscicultura.....	8
1.3 Uso da <i>Ulva lactuca</i> para peixes de produção.....	11
1.4 Inflamação em peixes.....	14
Referências bibliográficas.	16
CAPÍTULO I: Atividade antimicrobiana do extrato de <i>Ulva lactuca</i> contra bactérias isoladas em peixes nativos	20
Resumo.....	20
1. Introdução	21
2. Materiais e métodos	23
2.1 Obtenção do extrato	23
2.2 Citotoxicidade do extrato de <i>Ulva lactuca</i> por atividade hemolítica	23
2.3 Cepas bacterianas utilizadas no teste	24
2.4 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	24
3. Resultados	25
3.1 Composição do extrato de <i>Ulva lactuca</i>	25
3.2 Citotoxicidade do extrato de <i>Ulva lactuca</i> por atividade hemolítica	27
3.3 Susceptibilidade <i>in vitro</i> de bactérias patogênicas de peixes ao extrato de <i>Ulva lactuca</i>	27
4. Discussão.....	28
5. Conclusão	32
Agradecimentos	32
Referências bibliográficas	33
CAPÍTULO II: Avaliação dos parâmetros bioquímicos e da resposta inflamatória induzida por <i>Flavobacterium oreochromis</i> inativada em <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentado com dieta suplementada com extrato de <i>Ulva lactuca</i>	35
Resumo.....	35
1. Introdução	36
2. Materiais e métodos	37
2.1 Obtenção do extrato	37
2.2 Obtenção dos peixes, delineamento e preparo das dietas experimentais	39
2.4 Obtenção da cepa e preparo do inóculo	39

2.5 Indução da inflamação, coleta de sangue, exsudato e órgãos para histologia	40
3. Resultados	41
4. Discussão.....	46
5. Conclusão	49
6. Agradecimentos	49
Referências bibliográficas	49

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar até aqui, iluminando toda a trajetória que, por vezes, estava escurecida por incertezas e provações de fé.

Agradeço também minha falecida avó, Maria Clarisse, que com certeza está rezando por mim lá de cima, cheguei até aqui para honrar o sonho que deixou de ser apenas meu e se tornou da minha família e principalmente dela. Este sonho só foi possível graças a ajuda da minha mãe, Maria Eunice, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, sem a ajuda dela eu não conseguiria me sustentar durante este mestrado e não teria me graduado em veterinária a 400km longe de casa. Trabalhar com peixes não surgiu na minha cabeça ao acaso, mas sim da convivência com meu pai, Sérgio, de quem herdei um hobby e decidi que trabalharia para que ele pudesse continuar pescando.

Morando em Jaboticabal desde 2015, tive a oportunidade de fazer parte de uma grande família de pessoas estranhas, a República In-dependência, cada um deles contribuíram com o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Alguns ex-moradores veteranos como Henrique (Pirrrr), Bruno (Vitelo), Lucas (Travado) e Frederico (Margarida) me ajudaram mais neste último ano, com ajuda técnica e conselhos profissionais. Túlio (Mintiu) e Guilherme (Coice) me ajudaram em momentos que eu mais precisei em horários inconvenientes. Outros moradores me incentivaram a não desistir deste caminho, especialmente meu irmão Aluísio (Cubiraci) e Eduardo (Tiporrei). Aproveito este espaço para deixar um grande abraço a dezena de ex-moradores que me possibilitaram esta experiência ímpar e aos atuais moradores (Primo, Piza, D' oeste, Mífase, Rot-Uius e Reserva) que escreverão a história desta casa pelos próximos anos.

Agradeço também a minha orientadora Dra. Fabiana Pilarski por aceitar a orientar um aluno sem nenhuma experiência durante o estágio e me acolhendo durante esta jornada de mestrado, com certeza aprendi muito sobre o que é ser excelente um profissional. Eu não teria conseguido fazer nada deste trabalho sem a ajuda de toda a equipe: Profa. Fabiana, Suzana, Evandro, Inácio, Daiane, Elielma, Daniel, Fernando, Carlos, Bruno, Raphael e Geovana. Todos me ajudaram muito, tanto no delineamento quanto na coleta e no processamento das amostras,

especialmente a Daiane (que ficou 32 horas acordada e trabalhando no primeiro dia da coleta, ajudando no cultivo da bactéria, lavagem e preparação do inóculo e depois na coleta).

Agradeço ao Prof. Marco Belo e a sua aluna Camila por permitir e acompanhar a utilização do espectrofotômetro para as análises bioquímicas; à Profa. Elisabeth Urbinati, sua aluna Áurea e a técnica Damaris por permitirem o uso da centrífuga refrigerada, por permitir o uso do espectrofotômetro e estufas no teste de citotoxicidade e por ensinar a analisar a lisozima; e ao Prof. Ângelo Berchieri e seu aluno Túlio (Mintiu) por permitir e acompanhar a utilização da incubadora shaker. Agradeço também ao Prof. Levy e seus alunos com a colaboração nas análises do extrato da macroalga.

Agradeço às agências de fomento que permitiram a execução do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concessão número 301508/2019). Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - processo nº 2018/24499-8.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) [concessão 001] e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concessão número 301508/2019).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/24499-8.

RESUMO

As algas verdes marinhas são consideradas uma das bioreservas mais ricas do mundo, compostas por inúmeros compostos bioativos com propriedades versáteis e múltiplas atividades, que podem ser usadas na aquicultura como imunoestimulantes, antioxidantes e bactericidas contra bactérias potencialmente patogênicas para os peixes. Os testes *in vitro* avaliaram a susceptibilidade das principais bactérias patogênicas para peixes nativos, indicando que 9.375 mg/mL do extrato apresenta atividade bactericida para a *Flavobacterium oreochromis* e bacteriostático para as demais cepas testadas. Posteriormente, foi avaliado o efeito do uso do extrato de *Ulva lactuca* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, assim como a resposta celular à inflamação induzida na bexiga natatória por *F. oreochromis* em uma espécie nativa, em diferentes tempos de coleta. O extrato foi adicionado em ração comercial, separando quatro tratamentos: 10g/kg (extrato / ração), 20g/kg, 30g/kg e controle (ração não suplementada). Os materiais foram coletados em seis tempos: 0H – antes da indução, 3H – três horas após indução da inflamação, 6H, 12H, 24H e 48H. Dos componentes celulares presentes no sangue e no infiltrado inflamatório, apenas os trombócitos apresentaram diferenças significativas, principalmente nos peixes alimentados com 20g/kg de *U. lactuca*. As alterações histológicas são condizentes com quadros hemorrágicos e de inflamação. Nas análises bioquímicas, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides e albumina apresentaram interações entre tempo pós indução e tratamentos. De modo geral, a inclusão da macroalga não impacta de forma negativa na saúde do animal, mas o estudo carece de mais dados para comprovar a influência da macroalga na resposta inflamatória dos pacus.

Palavras-chave: alga, atividade antimicrobiana, bactérias, columnariose, peixes, inflamação, pacu.

ABSTRACT

Marine green algae are one of the richest bioreserves in the world, composed of bioactive compounds with versatile properties and multiple activities, which can be used in aquaculture as immunostimulants, antioxidants and bactericides against potentially pathogenic bacteria for fish. The *in vitro* tests evaluated the susceptibility of the main pathogenic bacteria for Brazilian's native fish, indicating that 9,375 mg/mL of the extract has bactericidal activity against *Flavobacterium oreochromis* and bacteriostatic for the other strains assessed. Subsequently, the effect of using *Ulva lactuca* extract on biochemical and hematological parameters was evaluated, as well as the cellular response to inflammation induced in the swim bladder by *F. oreochromis* in a native species, at different collection times. The extract was added to commercial feed, separating four treatments: 10g/kg (extract / feed), 20g/kg, 30g/kg and control (non-supplemented feed). The materials were collected at six times: 0H – before induction, 3H – three hours after inflammation induction, 6H, 12H, 24H and 48H. Of the cellular components present in the blood and in the inflammatory infiltrate, only thrombocytes showed significant differences, mainly in fish fed with 20g/kg of *U. lactuca*. Histological alterations are consistent with hemorrhagic and inflammation conditions. In biochemical analyses, alkaline phosphatase, cholesterol, triglycerides, and albumin showed interactions between post induction time and treatments. In general, the inclusion of macroalgae does not negatively impact the health of the animal, but the study lacks more data to prove the influence of macroalgae on the inflammatory response of pacu.

Key-words: algae, antimicrobial activity, bacteria, columnariosis, fish, inflammation, pacu.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Produção de peixes no Brasil

As projeções de crescimento populacional indicam que a demanda por alimentos crescerá exponencialmente, principalmente em países em desenvolvimento. Hoje, 89% da produção de animais aquáticos é destinada ao consumo humano (FAO, 2022) e considerando o território nacional, o Brasil é considerado um importante produtor de alimentos devido ao seu potencial de expansão na produção agrícola e pecuária (SAATH; FACHINELLO, 2018). A pandemia de COVID-19 impactou a produção aquícola mundial, pela redução do comércio e da captura extrativista, e os efeitos só foram atenuados porque a produção em cativeiro se manteve estável (FAO, 2022). Mesmo assim, houve uma redução na produção de organismos aquáticos durante os períodos de 2018-2020 quando comparado ao período de 2010-2018 (FAO, 2022).

Em 2019, o continente americano registrou uma produção um pouco maior do que quatro milhões de toneladas de peixes, crustáceos e moluscos, totalizando quase 20 milhões de dólares. Estes números tornam a América segunda colocada no ranking de produtores, atrás apenas da Ásia. Neste mesmo ano, o Brasil participou com a produção de mais de 600 mil toneladas de organismos aquáticos, arrecadando quase 1,2 milhões de dólares (FAO, 2021). A produção de algas ainda é menos explorada pelos países americanos, registrando aproximadamente 23 toneladas e totalizando mais de 61 milhões de dólares (FAO, 2021).

Em 2020, a aquicultura brasileira gerou 5,9 milhões de reais. A grande responsável por este montante foi a tilápia (2,3 milhões), seguida pelo camarão (1,3 milhão) e pelas espécies de peixes nativos, que juntas somam 1,5 milhão (IBGE, 2020). Algumas espécies se destacam em determinadas regiões brasileiras, como o tambacu, o pacu, a patinga e a tambatinga na região Centro-oeste; o camarão e a tilápia-do-Nilo no Nordeste; o tambaqui, o pirarucu, o pacu e a patinga na região Norte; a tilápia, o pacu e o lambari na região Sudeste e a tilápia-do-Nilo na região Sul (IBGE, 2020). A produção de plantas aquáticas em território brasileiro não apresenta a mesma significância em quantidade produzida e valor gerado, em relação às demais espécies de organismos aquáticos, posicionando o Brasil no 22º no ranking de países produtores em 2019 (FAO, 2021).

Considerando as estimativas de crescimento populacional, o Brasil se destaca como um dos maiores produtores de alimentos, tanto de origem vegetal quanto de origem animal – especialmente seu potencial para aquicultura; espera-se que o gigante sul-americano assuma um papel de protagonista. Para isso, é necessário incentivar e inovar o desenvolvimento da cadeia produtiva de peixes (SCHULTER; VIEIRA-FILHO, 2017).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie nativa da bacia do rio Paraná. A sobrepesca da espécie tem impactado os ecossistemas de água doce pois a espécie é um dos responsáveis pela dispersão de sementes, auxiliando na regeneração da vegetação. Além de sementes, eles podem se alimentar de folhas, caules, flores, frutos. Havendo necessidade, insetos, aracnídeos, moluscos e peixes menores também servem de alimento. As desovas ocorrem na estação chuvosa, entre outubro e dezembro, quando há uma abundância de alimentos nas áreas alagadas. A temperatura pode afetar a engorda do pacu em cativeiro, sendo tolerável até 22°C e uma oscilação térmica média de 6°C. O monitoramento da qualidade da água, uso de uma dieta balanceada e emprego de aeração mecânica podem otimizar o desempenho produtivo desta espécie. O pacu consegue tolerar concentrações de oxigênio dissolvido de até 3mg/L 0,025mg/L de amônia não ionizada e pH entre 6,5 e 9,0 (URBINATI; TAKAHASHI, 2020).

O sistema semi-intensivo é um dos principais utilizado por produtores de peixes redondos, como o pacu, devido seu baixo custo operacional, mas pode apresentar baixa produtividade por hectare. Pacu juvenil criado em sistema de bioflocos apresenta um desempenho produtivo maior do que juvenil criado em sistema de recirculação (SGNAULIN et al., 2021). A densidade de estocagem deve ser considerada para determinar a viabilidade da engorda do pacu em sistemas de tanques-rede, sendo que menores densidades apresentam maior desempenho (MACIEL et al., 2021; URBINATI; TAKAHASHI, 2020). O desenvolvimento da cadeia produtiva de peixes é impedido em parte por entraves econômicos como a burocracia no licenciamento ambiental, a falta de investimentos no desenvolvimento de novas tecnologias e qualificação de mão de obra e alta carga tributária (SCHULTER; VIEIRA-FILHO, 2017).

1.2 *Flavobacterium oreochromis* na piscicultura

Dentre os patógenos que acometem o pacu, destacam-se as bacterioses causadas por *Aeromonas veronii*, *A. hydrophila*, *A. dhakensis*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas putida*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio fluvialis* e *Flavobacterium columnare*. Estas bacterioses são responsáveis por grandes prejuízos na produção de espécies nativas.

Pouco se sabe sobre a patogenia destas doenças no organismo de peixes nativos, o que dificulta o desenvolvimento de tratamentos para controle de surtos e sua prevenção (FERREIRA et al., 2022).

A *F. columnare*, responsável pela columnariose ou doença da sela ou coluna, é uma bactéria estritamente aeróbica, Gram-negativa, produtora de sulfeto de hidrogênio, capaz de degradar polissacarídeos complexos presentes no tecido conjuntivo. Está distribuída por todo o mundo, sendo parte da microbiota de peixes de água doce, bem como da água da produção. Um peixe morto por columnariose pode se tornar uma fonte de infecção com maior potencial do que um peixe vivo, porém este peixe que sobreviveu ao surto pode se tornar um portador saudável, transmitindo a bactéria para outros hospedeiros susceptíveis. Além disso, esta bactéria pode sobreviver no ambiente aquático em determinadas condições físicas e químicas. A matéria orgânica presente no sedimento possui nutrientes suficientes para a sobrevivência da bactéria no ambiente, sendo possível um novo surto em uma determinada propriedade. Quando a *F. columnare* não está no hospedeiro, ela modifica a morfologia da colônia para uma forma menos virulenta para poupar energia (DECLERCQ et al., 2013).

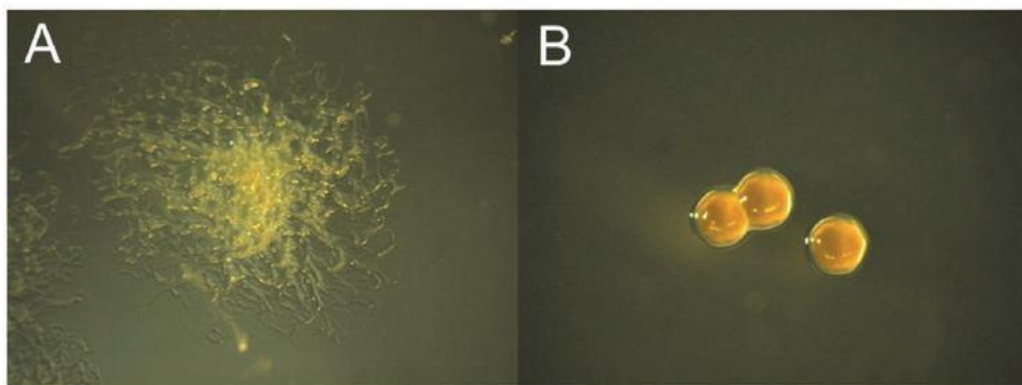


Figura 1. Características morfológicas das colônias de *Flavobacterium* spp. Fonte: LAANTO et al., 2012.

O avanço das técnicas moleculares permitiu uma melhor caracterização dos grupos genéticos da *F. columnare*, classificando-a em três dos quatro grupos como espécies diferentes através dos distintos perfis de ácidos graxos, MALDI-TOF, susceptibilidade a hospedeiros e virulência. Filogeneticamente, o grupo 1 se caracteriza como *F. columnare*, o grupo 2 se aproxima da *Flavobacterium covaie*, o grupo 3 se aproxima da *Flavobacterium davisii* e o grupo 4 se aproxima da *Flavobacterium oreochromis*. Embora a dispersão destes grupos ao redor do mundo seja um problema para peixes de produção e não de vida livre, o grupo 4 foi descrito apenas na América Latina e Ásia (LAFRENTZ et al., 2022).

Ferreira et al. (2022) observaram que no Brasil há uma nova cepa de *F. columnare* (hoje denominada de *F. oreochromis*) circulando no país, mais virulenta e resistente a baixas temperaturas. Em estudo de patogenicidade realizado para o pacu, a cepa, anteriormente isolada de tilápia-do-Nilo se mostrou altamente patogênica em doses baixas (1×10^2 , 1×10^4 e 1×10^5 UFC/ml com mortalidade de 50, 75 e 87,5%) para esta espécie nativa, o que pode ser um problema (transmissão da doença), principalmente para as espécies nativas que coabitam o mesmo ambiente das tilápias produzidas principalmente em tanques-rede.

A columnariose é caracterizada por lesões ulcerativas em brânquias, pele e nadadeiras dos peixes, possibilitando infecções secundárias por outros patógenos. Os sinais clínicos dependem da temperatura da água, idade do hospedeiro e da virulência da estirpe bacteriana. Estirpes com menor virulência, com temperatura da água acima de 21°C, podem provocar uma infecção progressiva e danos severos aos tecidos de peixes jovens antes da morte. Estirpes mais virulentas podem provocar infecções fulminantes, com alta mortalidade e sem danos severos aos tecidos de peixes jovens. As lesões são mais severas e agudas durante a fase juvenil de desenvolvimento do hospedeiro. Durante a fase adulta, a doença pode ser aguda, subaguda ou crônica, sendo que a forma aguda ou subaguda é marcada por lesões necróticas amareladas nas brânquias, evoluindo para total destruição do órgão. Na fase crônica, as lesões demoram mais para aparecer, surgindo próximas à nadadeira dorsal, circundadas por um alo avermelhado, podendo evoluir para completa deterioração da nadadeira. É possível a ocorrência de úlceras na mucosa oral, sendo esta lesão mais letal do que lesões na pele, uma vez que dificulta a alimentação do

peixe, resultando em anorexia e agravamento do quadro geral de saúde do hospedeiro (DECLERCQ et al., 2013).



Figura 2. *Piaractus mesopotamicus* apresentando lesões cutâneas compatíveis com columnaríose.

Fonte: arquivo pessoal.

No Brasil, alguns grupos de pesquisadores isolaram a *F. columnare* em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FIGUEIREDO et al., 2005) e em quatro espécies tropicais (PILARSKI et al., 2008). Pilarski et al. (2008) demonstraram que a alta temperatura da água pode estar relacionada com a ocorrência de lesões externas e aumento da mortalidade dos peixes. Portanto, presume-se que esta bactéria é de extrema importância para piscicultura nacional, uma vez que as principais espécies de interesse comercial podem ser afetadas nas épocas que as condições climáticas favorecerem os surtos, ou seja, na primavera e verão, ocasionando mortalidade e grandes prejuízos econômicos.

A *F. columnare* pode apresentar resistência antimicrobiana geneticamente adquirida. Mutações em genes *gyrase* estão relacionados com a resistência à quinolonas de primeira e segunda geração em cepas isoladas de trutas e carpas, que também expressaram o gene *tetA* de resistência à tetraciclina com resistência fenotípica à oxitetraciclina (DECLERCQ et al., 2021).

Além da resistência aos antimicrobianos, o tempo residual dos medicamentos na carne dos pescados também gera preocupações com a saúde humana. Estas questões levaram alguns países a proibirem o uso de antimicrobianos como moduladores de produtividade. Desta forma, os aditivos funcionais nas rações são alternativas interessantes para reduzir o uso de antimicrobianos na aquicultura mundial.

1.3 Uso da *Ulva lactuca* para peixes de produção

Aditivos funcionais são ingredientes não nutritivos incluídos na formulação da ração, com a finalidade de melhorar a qualidade da ração e/ou a saúde dos animais. A imunoestimulação promovida pelos aditivos funcionais ocorre através da ativação direta do sistema imunológico ou através da microbiota nativa dos intestinos, resultando em uma melhor atividade fagocitária, ativação de macrófagos, ativação do sistema complemento, atividade da lisozima, recrutamento leucocitário, entre outros parâmetros. Os imunoestimulantes são compostos naturais que estimulam o sistema imune do hospedeiro. São classificados pela origem, modo de ação e pela via de administração (RODRÍGUEZ-ESTRADA; RANZANI-PAIVA, 2019).

As macroalgas apresentam um grande potencial como aditivo funcional devido à variedade de compostos de interesse para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. A *Ulva lactuca* é uma espécie de macroalga que desperta interesse da indústria devido sua composição química: 60% de carboidratos, 10-47% de proteínas, 1-3% de lipídeos e 7-38% de minerais. Os principais compostos bioativos desta alga são os fenólicos, pigmentos (carotenóides e clorofila) e polissacarídeos (ulvana). Os compostos fenólicos apresentam atividade antialérgica e determinadas concentrações de polifenóis podem prevenir obesidade e síndrome metabólica. Os carotenoides possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante devido a habilidade de neutralizar radicais livres (PAPPOU et al., 2022).

Os polissacarídeos presentes na *U. lactuca* variam de 15 a 65% da massa seca. O principal polissacarídeo bioativo é a ulvana, polissacarídeo sulfatado composto por ramnose, ácido urônico, xilose e glucanos. A ulvana apresenta atividade antiviral, antioxidante, antitumoral, anticoagulante, anti-hiperlipidêmico, hepatoprotetor, imunoestimulante (PAPPOU et al., 2022), antioxidante (PAPPOU et al., 2022; SUNDARI; WIJAYA, 2021) e anti-inflamatória (MO'O et al., 2020; SUNDARI; WIJAYA, 2021).

Alguns estudos avaliaram a utilização do gênero *Ulva* spp. como aditivo na ração para organismos aquáticos para promover maior desempenho produtivo e performance digestiva e saúde (THARAKA et al., 2020). Cruz-Suárez et al. (2009) compararam a adição de *U. clathrata*, *Macrocystis pyrifera* e *Ascophyllum nodosum*

na ração de *Litopenaeus vannamei* (camarão-branco-do-pacífico), observando que os animais que receberam ração suplementada com *U. clathrata* tiveram maior crescimento e hidro estabilidade dos pellets. A inclusão de 5% de *U. lactuca* na dieta de juvenis de *Lutjanus stellatus* (pargo-pintado) contribuiu com o maior crescimento e higidez dos peixes devido à atividade antioxidante e saúde hepática (ZHU et al., 2016).

A suplementação de 50 g/kg de *Ulva lactuca* na dieta da roncadeira-austral (*Argyrosomus japonicus*) é recomendada, pois essa dose não ocasiona efeitos negativos no desempenho produtivo e na utilização do alimento. Estudos hematológicos e bioquímicos também demonstraram que essa dose é segura e não causa efeitos adversos na fisiologia desta espécie (MADIBANA et al., 2017).

THARAKA et al. (2020) alimentaram o falso-alabote-japonês (*Paralichthys olivaceus*) durante 12 semanas com uma combinação de algas em pó (*Ulva lactuca*, alface do mar e alga vermelha) incluídas na ração com baixa quantidade de proteína (44%) e observaram que a inclusão desta combinação mostrou efeitos positivos em todos os parâmetros avaliados (similares ou superiores ao grupo alimentado com ração contendo alta quantidade de proteína na dieta - 55%), como maior desempenho produtivo, utilização do alimento, digestibilidade, número de células caliciformes e vilosidades intestinais. A resposta imune não específica também foi superior nos peixes alimentados com a combinação de algas, principalmente a lisozima, imunoglobulinas, anti-protease, superóxido dismutase e catalase, além de maior sobrevivência após desafio com a bactéria *Edwardsiella tarda*.

Pesquisadores avaliaram a composição da *Ulva lactuca* e alimentaram tilápia-do-Nilo com uma combinação da alga com probióticos e L-carnitina e observaram que os peixes alimentados com essa combinação tiveram maior quantidade de células vermelhas, maior valor de hematócrito, de leucócitos, provavelmente devido a maior quantidade de carboidratos complexos e polissacarídeos presentes na alga. Este estudo também concluiu que a alga é rica em proteína (22%) e nutricionalmente superior as plantas terrestres, provendo proteína de qualidade tanto para peixes quanto para humanos (EL-MESSALAMY et al., 2021).

Na Tunísia, pesquisadores avaliaram a composição química e as propriedades funcionais da *U. lactuca* e verificaram que esta espécie é uma boa fonte de fibra alimentar, sendo a hemicelulose a porção mais abundante, além de ser rica em

proteínas e ácidos graxos poliinsaturados, como os ácidos oleicos, linoleicos e linolênicos. Entretanto, o teor de metais pesados das algas retiradas da região costeira daquele país impede o consumo humano, mas não impede a extração dos compostos específicos como a ulvana (polissacarídeo sulfatado) (YAICH et al., 2011).

Os efeitos anti-inflamatórios da ulvana são vasculares, atuando na via da bradicinina (MO'O et al., 2020). As proteases de mastócitos ativados lisam as proteínas C3 e C5 do sistema complemento, formando pequenos peptídeos C3a e C5a. Os peptídeos C3a e C5a promovem a degranulação dos mastócitos, compostos calicreínas. As calicreínas são proteases que atuam sobre os cininogênios, formando pequenos peptídeos vasoativos denominadas de cininas, como a bradicinina. As cininas apresentam atividade antimicrobiana, modulam a dor e prurido, estimulam os neutrófilos e aumentam a permeabilidade vascular (TIZARD, 2014).

Polissacarídeos hidrossolúveis de outro exemplar do gênero *Ulva* spp. pode melhorar o crescimento, resposta imune indireta e a atividade de enzimas antioxidantes. Akbary; Aminikhoei (AKBARY; AMINIKHOEI, 2018) investigaram os efeitos do extrato de *U. rígida* em juvenis de *Mugil cephalus*, tainha, e verificaram que 10mg/kg do extrato de polissacarídeos hidrossolúveis estimularam a atividade da lisozima, atividade respiratória dos leucócitos e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutatona e malondialdeído.

O uso de macroalgas como aditivos funcionais também é estudado em outras espécies animais. Um dos problemas mais investigados em ruminantes é a produção de metano. Machado et al. (2014) avaliaram a fermentação *in vitro* de 20 espécies de macroalgas incubadas com fluido ruminal por 72 horas, quantificando a produção total de gás e a produção de metano, e verificaram que macroalgas dos gêneros *Dictyota* spp. e *Asparagopsis* spp. reduzem em mais de 53% a produção total de gases e em mais de 90% a produção de metano. Posteriormente, Machado et al. (2016), estudaram os bioativos presentes na macroalga *A. taxiformis* e verificaram que o bromofórmio é o principal bioativo com potencial antimetanogênico *in vitro*, estando presente em quantidades suficientes na biomassa.

1.4 Inflamação em peixes

Diante de uma infecção por patógeno, o sistema imune responde de maneira inata e adaptativa. A resposta imune inata é ativada imediatamente após a entrada do microrganismo agressor para eliminá-lo. Esta resposta imune inata é mediada por células e moléculas. As células, especialmente os fagócitos, são responsáveis por fagocitar os patógenos e participam da apresentação do antígeno ao sistema imune. As moléculas se ligam aos antígenos para sinalizar a presença do patógeno. A inflamação é uma resposta inata ao processo de infecção, algumas das células envolvidas na inflamação também auxiliam no reparo dos tecidos acometidos (TIZARD, 2014).

A resposta imune adquirida envolvendo linfócitos B e T é menos desenvolvida em teleósteos, portanto, a resposta inata é o principal mecanismo de defesa, através de mediadores moleculares e celulares (SOUSA et al., 2022). As moléculas associadas diretamente ao patógeno são denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), enquanto as moléculas associadas às células mortas ou danificadas são denominadas de padrões moleculares associados à lesão (DAMPs) (TIZARD, 2014). DAMPs e PAMPs interagem com receptores de reconhecimento padrão (PRRs) de células sentinelas, resultando na ativação do sistema imune inato (TIZARD, 2014). Além dos PAMPs, as células hospedeiras também reconhecem os padrões moleculares associados à micróbios (MAMPs) (SOUZA et al., 2022).

Os principais PRRs são do tipo Toll-like receptors (TLRs) que estão localizados no interior e no exterior das células para detecção de patógenos intracelulares e extracelulares, respectivamente (TIZARD, 2014). Quando um PAMP se liga a um TLR específico, formam-se complexos proteicos que sinalizam e ativam a transdução de sinais, resultando na formação de citocinas pró-inflamatória (TIZARD, 2014). Dos 13 tipos de TLRs identificados em mamíferos, TLR6 e TLR10 não existem no genoma dos teleósteos (LIU et al., 2022). O número de TLR nos teleósteos varia entre as espécies, provavelmente devido a diversidade de microrganismos patogênicos no ambiente aquático que variam com as condições paleoclimáticas, como no caso do bacalhau (*Gadus morhua*) do ártico e do peixe-zebra (*Danio rerio*) que apresentam 43 e 24 tipos de TLRs, respectivamente (SOUSA et al., 2022). O TLR14, relatado em

diversas espécies de peixes, foi identificado como um possível substituto TLR6 ou TLR10 (LIU et al., 2022).

Em teleósteos, os TLRs podem recrutar cinco tipos de proteínas adaptadoras para iniciar a via de sinalização, sendo elas a MyD88, TRIF, TIRAP, SARM e BCAP (LIU et al., 2022). A via MyD88-dependente ativa duas vias distintas envolvendo o fator de transcrição NF- κ B e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), resultando na produção de citocinas pró inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (tnf- α), interleucina tipo 1 β (il-1 β) e interleucina tipo 6 (il-6) (LIU et al., 2022).

Outros PRRs que participam da resposta imune inata são os receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs ou NOD-like receptors), que ativam a via do NF- κ B e desencadeia a produção de citocinas pró inflamatórias e proteínas antimicrobianas, como a defensina (TIZARD, 2014). Os NLRs atuam como sentinelas intracelulares, juntamente com outros PRRs, traduzindo sinais de respostas pró-inflamatória e regulando a homeostase tecidual (CHUPHAL; RAI; ROY, 2022). Os teleósteos apresentam uma vasta variedade de NLRs, como o Zebrafish que possui aproximadamente 400 em seu genoma (CHUPHAL; RAI; ROY, 2022). Curiosamente, os NLRs de teleósteos compartilham semelhanças com NLRs de mamíferos, exceto p NLR C-like que é único nos peixes (CHUPHAL; RAI; ROY, 2022). Durante uma infecção bacteriana ou viral há uma maior expressão de NLR1 e NLR2 em peixes (CHUPHAL; RAI; ROY, 2022).

Os macrófagos, mastócitos, células dendríticas e células do epitélio do sistema respiratório e do intestino são chamadas de células sentinelas. Quando ativadas produzem quimiocinas que modulam a resposta inflamatória, estimulando a migração celular e controlando a duração do processo inflamatório (TIZARD, 2014).

As principais citocinas envolvidas na inflamação, tnf- α , il-1 β e il-6, também apresentam atividades metabólicas. Promovem catabolismo de proteínas da musculatura esquelética para disponibilizar aminoácidos, que são utilizados na produção de anticorpos e citocinas. O tnf- α inibe a captação de lipídeos pelos pré-adipócitos, resultando na perda de peso. Também ativam a síntese de proteínas de fase aguda, como PRRs solúveis, proteínas do sistema complemento, inibidores de proteases e proteínas ligantes de ferro. Estas proteínas ligantes de ferro são

importantes devido a competição das células do hospedeiro com as bactérias que também dependem do ferro para seu crescimento (TIZARD, 2014).

Diferentes espécies são utilizadas no estudo da inflamação em peixes. Marinque et al. (2017), verificaram que o pacu pode ser utilizado como modelo para estudar a resposta inflamatória granulomatosa crônica na musculatura induzida pelo bacilo Calmette-Guérin (BCG), por apresentar uma cinética celular semelhante a inflamação causada por *Mycobacterium marinum*. Tilápias-do-Nilo foram utilizadas por Charlie-Silva et al. (2019) para avaliar a expressão de proteínas de fase aguda (PFAs) durante aerocistite induzida por *Aeromonas hydrophila* e verificaram que a modulação da expressão de PFAs é semelhante aos humanos, com aumento de ceruplasmina, haptoglobina, α -2-macroglobulina e complemento C3, e redução da albumina e da transferrina. A cinética celular no exsudato demonstrou um acúmulo significativo de trombócitos, macrófagos, linfócitos e predominância de granulócitos, com maior produção de espécies reativas ao oxigênio.

A resposta celular pode ser avaliada através de agentes flogógeno, como bactérias (CHARLIE-SILVA et al., 2019) e a carragenina (RODRIGUES-SOARES et al., 2018), pois induzem a migração celular para o local de inflamação. Por ser um órgão cavitário e delimitado, é comum inocular agentes flogógenos na bexiga natatória para induzir uma aerocistite porque a inoculação e a coleta do exsudato inflamatório têm um acesso mais fácil (CHARLIE-SILVA, et al. 2019).

Apesar de todos os avanços obtidos na aquicultura com o uso de aditivos nutricionais e o estudo da inflamação induzida, não há relatos na literatura sobre o efeito da inclusão dietária de *Ulva lactuca* na inflamação induzida por *F. columnare* na bexiga natatória de pacu.

Referências bibliográficas.

AKBARY, P.; AMINIKHOEI, Z. Effect of water-soluble polysaccharide extract from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity, and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 1345–1353, 1 abr. 2018.

CHARLIE-SILVA, I. et al. Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

- CHUPHAL, B.; RAI, U.; ROY, B. Teleost NOD-like receptors and their downstream signaling pathways: A brief review. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 3, p. 100056, dez. 2022.
- CRUZ-SUAREZ, L. E. et al. Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 421–430, ago. 2009.
- DECLERCQ, A. M. et al. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. **Veterinary Research**, v. 44, n. 27, 2013.
- DECLERCQ, A. M. et al. Comparative genomics of *Flavobacterium columnare* unveils novel insights in virulence and antimicrobial resistance mechanisms. **Veterinary Research**, v. 52, n. 1, 1 dez. 2021.
- EL-MESSALAMY, A. M. D. et al. Phytochemical constituents of *Ulva lactuca* and supplementation to improve the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) haemato-biochemical status. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 2663–2670, 2021.
- FAO. FAO STATISTICS. **FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019**, 2021.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards blue transformation**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022.
- FERREIRA, D. DE A. R. et al. Morpho-molecular identification, pathogenicity for *Piaractus mesopotamicus*, and antimicrobial susceptibility of a virulent *Flavobacterium columnare* isolated from Nile tilapia cultured in Brazil. **Aquaculture**, p. 738486, jun. 2022.
- FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 199–204, 2005.
- IBGE. **Dados SIDRA - Produção da pecuária municipal 2019**. Rio de Janeiro, 2020.
- LAANTO, E. et al. Phage-driven loss of virulence in a fish pathogenic bacterium. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 31 dez. 2012.
- LAFRENTZ, B. R. et al. The fish pathogen *Flavobacterium columnare* represents four distinct species: *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium covae* sp. nov., *Flavobacterium davisii* sp. nov. and *Flavobacterium oreochromis* sp. nov., and emended description of *Flavobacterium columnare*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 2, 1 abr. 2022.
- LIU, R. et al. Fish-specific Toll-like receptor 14 (TLR14) from Asian swamp eel (*Monopterus albus*) is involved in immune response to bacterial infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 124, p. 313–323, 1 maio 2022.
- MACHADO, L. et al. Effects of marine and freshwater macroalgae on in vitro total gas and methane production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 22 jan. 2014.
- MACHADO, L. et al. Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity in vitro. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 3117–3126, 1 out. 2016.
- MACIEL, H. M. et al. Densidade de estocagem de peixes nativos e seus híbridos criados em tanques-rede. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e225101018591, 18 ago. 2021.

- MADIBANA, M. J. et al. Effect of graded levels of dietary seaweed (*Ulva* sp.) on growth, hematological and serum biochemical parameters in dusky kob, *Argyrosomus japonicus*, sciaenidae. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 43, p. 249–254, 2017.
- MANRIQUE, W. G. et al. Inflamación crónica granulomatosa en el pez teleósteo *Piaractus mesopotamicus*: Modelo de estudio histopatológico. **Revista MVZ Cordoba**, v. 22, n. 1, p. 5738–5746, 1 jan. 2017.
- MO'O, F. R. C. et al. Ulvan, a polysaccharide from Macroalga *Ulva* sp.: A review of chemistry, biological activities and potential for food and biomedical applications. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 16, 1 ago. 2020.
- PAPPOU, S. et al. Extraction of Bioactive Compounds from *Ulva lactuca*. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 4, 1 fev. 2022.
- PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Braz. J. Biol**, v. 68, n. 2, p. 409–414, maio 2008.
- RODRIGUES-SOARES, J. P. et al. Induced aerocystitis and hemato-immunological parameters in Nile Tilapia fed supplemented diet with essential oil of *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 1, 2018.
- RODRÍGUEZ-ESTRADA, U.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Aditivos funcionais nas rações para aquicultura. Em: RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. (Eds.). **Biotecnologia e sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Associação de Patologistas de Organismos Aquáticos (ABRAPOA), 2019. p. 81–110.
- SAATH, K. C. DE O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195–212, 1 abr. 2018.
- SCHULTER, E. P.; VIEIRA-FILHO, J. E. R. **Texto para discussão - Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico da cadeia produtiva de tilápia**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br>>. Acesso em: 22 maio. 2022.
- SGNAULIN, T. et al. Culture of pacu *Piaractus mesopotamicus* in biofloc technology (BFT): insights on dietary protein sparing and stomach content. **Aquaculture International**, v. 29, n. 5, p. 2319–2335, 1 out. 2021.
- SOUSA, C. et al. Toll-Like Receptor Evolution: Does Temperature Matter? **Frontiers in Immunology**, v. 13, 14 fev. 2022.
- SUNDARI, L. P. R.; WIJAYA, P. A. W. Sea lettuce (*Ulva lactuca*) as a source of dietary antioxidant. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 5, n. 4, p. 603–608, 1 abr. 2021.
- THARAKA, K. et al. Algae-clay powder (sea lettuce, *Ulva lactuca* and red algae, *Solieria chordalis* in exfoliated micronized montmorillonite) supplementation in a fish meal-reduced diet for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 1–8, 2020.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. v. 1
- URBINATI, E. C.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotâmicus*). Em: BALDISSEROTTO, B. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 3ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2020. v. 1p. 169–200.

YAICH, H. et al. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 895–901, 15 out. 2011.

ZHU, D. et al. The green alga *Ulva lactuca* as a potential ingredient in diets for juvenile white spotted snapper *Lutjanus stellatus* Akazaki. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 703–711, 1 fev. 2016.