

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

Ingrid Camargo dos Reis

Bióloga

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM β -GLUCANO
POTENCIALIZA A EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA
IMUNE EM TILÁPIAS-DO-NILO VACINADAS**

Dracena
2021

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

Ingrid Camargo dos Reis

Bióloga

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM β -GLUCANO
POTENCIALIZA A EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA
IMUNE EM TILÁPIAS-DO-NILO VACINADAS**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jaqueline Dalbello Biller
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Camino Fierro Castro

Dracena
2021

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

R3751e

Reis, Ingrid Camargo dos.

Efeitos do inseticida Diazinon em células de Hepatocarcinoma humano (hepg2) / Ingrid Camargo dos Reis.

-- Dracena: [s.n.], 2021.

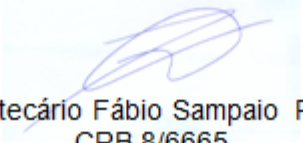
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2021.

Orientadora: Jaqueline Dalbello Biller

Coorientadora: Maria del Camino Fierro Castro

1. Peixe. 2. Imunidade. 3. Vacinação. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas
CRB 8/6665

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Suplementação dietética com β -glucano potencializa a expressão de genes do sistema imune em tilápias-do-nilo vacinadas

AUTORA: INGRID CAMARGO DOS REIS **ORIENTADORA:** JAQUELINE DALBELLO BILLER
COORIENTADORA: MARIA DEL CAMINO FIERRO CASTRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena – UNESP

Profa. Dra. ELISABETH CRISOULO URBINATI (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. MAURÍCIO LATERÇA MARTINS (Participação Virtual)
Departamento de Aquicultura / Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC



Documento assinado digitalmente
Maurício Laterça Martins
RUA: XV/22.000 1524 01 000
CPF: 662.373.906-73

Dracena, 15 de dezembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

INGRID CAMARGO DOS REIS – nascida em São Paulo, no dia 23 de janeiro de 1995, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Engenharia – UNESP – Campus de Ilha Solteira em 2018. Durante sua graduação fez parte de diversos projetos, realizou cursos na área ambiental, participou de vários congressos e desenvolveu uma iniciação científica intitulada “Detecção de fármacos residuais na zona rural de Ilha Solteira – SP” realizada sob orientação do Prof. Drº. Maurício Augusto Leite. Em fevereiro de 2019 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – UNESP, Campus de Dracena, e em 2020 submeteu sua dissertação à banca examinadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ajudou a realizar esse trabalho com sucesso.

Aos meus pais e minhas irmãs que são meu alicerce, mesmose longe me enviaram força e incentivo.

Á minha orientadora profª Drª Jaqueline Dalbello Biller, pela orientação, paciência e oportunidade que serviram como pilares de sustentação para a conclusão deste trabalho. Obrigada pela confiança.

Á minha coorientadora profª Drª Maria del Camino Firerro Castro, pela paciência, pela forma que me motivava e partilhava seu conhecimento comigo, ajudando-me a construir esse trabalho de forma satisfatória. Minha eterna gratidão.

Á profª Drª Flavia Thomaz Verechia Rodrigues, pela ajuda nas coletas e pelos conselhos como amiga.

Aos integrantes do grupo LIA, Thais, Victor, Eduardo, Ana Paula, Nathalia, Basia e Raphael que foram de extrema importância para concluir esse trabalho.

As minhas duas amigas, Samara e Amanda que foram essenciais nessa caminhada durante o mestrado. Sou eternamente grata pela amizade de vocês e por todos os conselhos que me ajudaram tanto.

Á minha amiga Thais Cristina que foi minha companheira na vida e nesses dois anos de mestrado. Gratidão por você fazer parte da minha história.

Á República Apartadas, que me acolheram calorosamente e se tornaram minha segunda família em Dracena.

Ao meu amigo Henrique que alegrou a minha vida com a sua chegada e sempre terá um lugar especial no meu coração.

As minhas amigas de graduação, Ana Luisa, Maria Laura e Julia que mesmo de longe, sempre me deram forças e torceram por mim.

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

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

**“Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória
é o desejo de vencer.”**

Mahatma Gandhi

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



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



Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito 'trained immunity' do β -glucano em tilápias vacinadas e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* sobre a expressão de genes pró-inflamatórios e desempenho zootécnico" (Evaluation of the 'trained immunity' effect of β -glucan in tilapia vaccinated and challenged with *Streptococcus agalactiae* on the expression of pro-inflammatory genes and zootechnical performance), registrada com o nº 16/2018.R1 – CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Jaqueline Dalbello Biller** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de **12/07/2018**.

Dracena, 12 de julho de 2018.

Profa. Dra. **Sirlene Aparecida Maestá**
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

RESUMO

A produção de peixes está crescendo mais a cada ano e com isso surgem problemas com estresse causados pela qualidade da água e resistência a microrganismos. Substâncias bioativas podem influenciar nas respostas do sistema imune de peixes, nos últimos anos o β -glucano está sendo estudado por modular parâmetros imunes, ampliando a resistência contra enfermidades. Assim, o experimento buscou avaliar se a suplementação na dieta com β -glucano juntamente com a vacinação potencializa o efeito prolongado da resposta imune de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) frente a um desafio imunológico com bactéria de *S. agalactiae* inativada nos genes das interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α), imunoglobulina M (IgM), proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons (Hsp70), lisozima (Lys) e C3 do complemento em baço e em rim cranial. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com 11 tratamentos, em três tempos de amostragem (15, 30 dias após a vacinação e 15 dias após o desafio). Ao final dos 15 dias de alimentação houve a vacinação comercial contra *S. agalactiae* nos peixes do tratamento 3 e 4. Além da vacinação, no grupo 3 houve a alteração da dieta controle para a dieta com β -glucano. Ao final dos 30 dias depois da vacinação, todos os peixes de todos os tratamentos foram desafiados com bactéria de *S. agalactiae* inativada. Os resultados mostraram que, a dieta com β -glucano associado com a vacinação e ao desafio com microrganismos *S. agalactiae* inativados, mostraram ter grande eficiência na expressão dos genes no rim cranial principalmente nas citocinas e também a IgM no baço. Observou-se que os genes obtiveram sua expressão mais alta após os 30 dias de vacinação e quase todos os genes foram expressos em maior quantidade no rim cranial do que no baço, com exceção do IgM que teve sua maior expressão no baço. Portanto, pode-se afirmar que o β -glucano tem potencial adjuvante para vacina contra *S. agalactiae*, podendo atuar no controle e na prevenção de estreptococoses.

Palavras chaves: Peixe, imunidade, vacinação e desafio.

ABSTRACT

The production of exotic fish is increasing more each year and with that comes along problems like stress due to density, water quality and resistance to microorganisms. Since bio-active substances can influence the responses of the immune system of fish, in recent years β -glucan has been extensively studied for modulating immune parameters, increasing resistance against diseases. Therefore, the experiment expected to see if the supplementation in the diet with β -glucan together with vaccination enhances the prolonged effect of the immune response in the face of a challenge with inactivated *S. agalactiae* bacteria. Facing an immunological challenge with inactivated *S. agalactiae* bacteria in the genes of interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), necrosis factor tumor (TNF- α), immunoglobulin M (IgM), 70 kilodalton heat shock proteins (Hsp70), lysozyme (Lys) and complement C3 in spleen and cranial kidney. The experiment was carried out in a completely randomized design with 11 treatments, in three feeding times (15, 30 days after vaccination and 15 days after the challenge). At the end of the 15 days of feeding, there was a commercial vaccination against *S. agalactiae* in fish from treatment 3 and 4. In addition to vaccination, in group 3 there was a change from the control diet to the β -glucan diet. At the end of 30 days after vaccination, all fish from all treatments were challenged with inactivated *S. agalactiae* bacteria. The results showed that, the β -glucan diet associated with vaccination and the challenge with inactivated *S. agalactiae* microorganisms, showed to be highly efficient in the expression of genes in the cranial kidney, mainly in cytokines and also in the spleen IgM. It was possible to observe that the genes obtained their highest expression after the 30 days of vaccination and almost all genes were expressed in greater quantity in the cranial kidney than in the spleen, with the exception of IgM which had its greatest expression in the spleen. Therefore, it can be said that β -glucan may have adjuvant potential for vaccine against *S. agalactiae*, being able to act in the control and prevention of streptococci.

Key words: fish, immunity, vaccination and challenge.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Modelo Biológico	16
2.2	Enfermidades Comuns Presentes Na Piscicultura	17
2.3	Sistema Imune Dos Peixes	18
2.4	Sistema Imune Inato Ou Não Específico.....	18
2.4.1	Barreiras de defesa	19
2.4.2	Componentes do sistema inato humoral	20
2.4.3	Sistema complemento	20
2.4.4	Lisozima	21
2.4.5	Imunidade inata mediada por células.....	22
2.5	Sistema Adquirido Ou Específico De Defesa	23
2.6	Citocinas.....	24
2.7	Genes Do Sistema Imune	25
2.8	Anticorpos	26
2.9	Tecidos E Órgãos Do Sistema Imune	27
2.7	Células Inatas e Do Sistema Adquirido	29
2.8	β -Glucano.....	32
3	Objetivo	35
3.1	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.2	Animais.....	36
4.3	Dieta.....	37
4.4	Delineamento Experimental	38
4.3	Realização do desafio com <i>S. agalactiae</i> inativada (bacterina)	41
4.7	Extração De RNAe Construção De Biblioteca De cDNA	42
4.4	Determinação Molecular Da Expressão De Genes	43
4.5	Análise Estatística	46
5	RESULTADOS	47

	5.1.Determinação Molecular Da Expressão De Genes Por qPCR-RT	47
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma ampla área territorial que favorece diversas atividades do agronegócio, entre elas, a aquicultura está desenvolvendo um cenário promissor para a economia do país (VALLADÃO *et al.*, 2018). A produção de peixe está tornando o acesso ao pescado mais fácil para o consumidor, dessa forma, o objetivo da aquicultura é maximizar a eficiência e melhorar a rentabilidade da produção (GARCIA, 2008; VALLADÃO *et al.*, 2018).

Uma das espécies mais produzidas no mundo é a *Oreochromis niloticus*, da família Ciclideos, popularmente conhecida como tilápia- do- Nilo, pois são naturais dos rios Nilo, Niger e Tchade (CAVALCANTE, 2015).

Embora a tilápia-doNilo não seja um animal nativo, é a espécie de peixe mais produzido no país, devido suas fortes características zootécnicas como: alta taxa de reprodução, são onívoras e possuem fácil adaptação em uma diversas condições de ambientes (ZHANG *et al.*, 2019).

O Brasil está entre os 5 maiores produtores de tilápia do mundo ficando atrás somente da China, Indonésia e Egito, sendo o Paraná e São Paulo são os estados que mais produzem a espécie (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2014).

Com a intensificação da produção houve aparecimento de diversas enfermidades, como bactérias, fungos, vírus e parasitas que podem causar um enorme prejuízo econômico (ZHANG *et al.*, 2019). Além desse problema, há também impactos negativos no ambiente, como acúmulo de resíduos e resistência bacteriana; devido ao uso inadequado de quimioterápicos e antimicrobianos (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2014; GATLIN *et al.*, 2006).

No Brasil, as altas temperaturas no verão propiciam aumento da ocorrência de bacteriose oportunistas, como: *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp. e *Enterococcus* spp. em diversas regiões do país prejudicando a produção dos peixes (GARCIA, 2008; SEBASTIÃO *et al.*, 2015).

A estreptococose já causou perdas de milhões de dólares e são a maior causadora de mortalidade de tilápia no mundo. Essa pode ser causada por *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* e *Streptococcus difficilis*. Porém a *Streptococcus agalactiae* é a que mais causas prejuízos econômicas em fazendas de tilápia no Brasil (SEBASTIÃO *et al.*, 2015)

Entretanto os surtos de streptococcus spp estão presentes em diversas partes do mundo, como Israel, Japão, Estados Unidos e Brasil e tem sido descritos tanto em espécies de água doce quanto marinho (WHITTINGTON *et al.*, 2005).

As Streptococoses estão presentes em espécies como: *Trachinotus ovatus*, *Colossoma macropomum*, *Brevoortia patronus*, *Sparus auratus*, *Dasyatis sp* e *Mugil cephalus* (FIGUEIREDO *et al.*, 2006)

É relatado dificuldade para tratar doenças com antibióticos por diversos fatores, tais como: dificuldade em fazer a dosagem do antibiótico na ração, perda de apetite de peixes que estão doentes e eliminação somente dos sinais clínicos da doença (LEIRA *et al.*, 2017).

Para ajudar na prevenção de algumas doenças, foram desenvolvidas vacinas para proteger os peixes, porém seus efeitos são modestos e possuem algumas desvantagens como: as propriedades do antígeno de superfície são facilmente alteradas e algumas vacinas de subunidades precisam de reforços (ZHANG *et al.*, 2017).

Nesse contexto, há uma busca contínua sobre substituir o uso de substâncias sintéticas e potencializar a atuação das vacinas através de materiais bioativos naturais capazes de influenciar na resposta imunológica e no desempenho produtivo dos peixes (GARCIA, 2008).

Uma estratégia é promover a imunomodulação com uso de suplementos alimentares, tais como vitaminas, minerais, prebióticos, probióticos e imunoestimulantes (GARCIA, 2008)

Alguns exemplos de utilização de suplementos alimentares são vitamina E e C que mostraram ser eficientes no aumento da migração de células de defesa para a bexiga natatória, após as tilápias serem desafiadas (MARTINS *et al.*, 2012).

O levamisol que é um anti-helmíntico também é citado na literatura como um suplemento da dieta que modula o sistema imune do pacu, mostrando resultados positivos em alterações nos parâmetros imunológicos e hematológico BILLER-TAKAHASHI *et al*, 2014).

Dentre os imunoestimulantes mais estudados está o β -glucano por estimular o sistema imune não específico dos peixes, promovendo uma ação pluripotente, pois há estudos evidenciando ações imunomoduladora, anti-infecciosa e anti-inflamatórias do produto, e que também tem capacidade de aumentar as concentrações de

anticorpos e estimular a atividade dos macrófagos (CASTRO *eta.l.*,2002; WHITTINGTON *et al.*,2005).

Além disso, os imunoestimulantes conseguem influenciar a produção de citocinas que são proteínas reguladoras do sistema imunológico e que estão envolvidas no sistema endócrino.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do β -glucano em tilápias vacinadas e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* inativada sobre a imunidade, pela-expressão de genes do sistema imune.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modelo Biológico

As tilápias-do-nilo são originárias do continente africano e Oriente Médio; e foram introduzidas há mais de 40 anos no Brasil (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2014). Essa espécie é considerada cosmopolita devido as características zootécnicas que favorecem sua adaptação em diferentes partes do mundo, pois apresenta fácil reprodução, são onívoras e se adaptam bem a altas temperaturas e salinidade (VICENTE *et al.*, 2014).

Elas apresentam carne branca com excelente qualidade no filé que favorece sua aceitação no mercado e não apresentam espinhos em formato de “Y”. Essa qualidade está associada ao fato da tilápia-do-nilo se adaptar a qualquer dieta e quando são submetidas a dietas artificiais desde seu estágio larval crescem saudáveis, proporcionando filés de ótima qualidade. (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004).

Outro fator que facilita sua criação é a adaptação ao sistema de produção em tanques-redes, que tem como característica a renovação de água, removendo os metabólitos produzidos pela tilápia, aumentando o desempenho e adaptação em sistemas intensivos de produção (VICENTE *et al.*, 2014).

As tilápias-do-Nilo têm alta capacidade de reprodução e sua maturidade sexual é atingida entre o 3º e o 4º mês. Elas apresentam crescimento acelerado quando submetidas a criação intensiva (VICENTE *et al.*, 2014).

A produção de tilápia-do-nilo é a que mais cresce no mundo, é a segunda espécie mais cultivada no mundo e a primeira no Brasil, ficando atrás somente do Chile na América do Sul (VICENTE *et al.*, 2014).

O Ceará é considerado o principal consumidor de tilápias no Brasil e no mercado exterior os Estados Unidos e a Espanha são os maiores consumidores da produção brasileira. Essa comercialização internacional ocorre na forma de filés congelados ou o peixe inteiro congelado (CANAL RURAL, 2018).

Além disso, ainda é exportada a pele da tilápia-do-nilo que é rica em colágeno e que é utilizada tanto na indústria farmacêutica quanto alimentícia (CANAL RURAL, 2018).

A produção desse peixe movimenta a indústria de alimentos, serviços e medicamentos, devido a sua importância e distribuição pelo país, e a espécie foi eleita como modelo biológico do presente estudo para avaliar os efeitos imunoestimulantes do β -glucano (AZEVEDO-SANTOS, 2011).

2.2 Enfermidades Comuns Presentes Na Piscicultura

Em 1939 houve o primeiro relato sobre a bactéria gram - positiva intracelular e que continua sendo um importante agente oportunista, reconhecida como principal causa de zoonose. Além do homem, ela também possui uma variedade de hospedeiros, como cão, gatos, peixes, sendo a tilápia a mais sensível entre eles. Por isso, diversas fazendas têm sofrido com surtos contínuos de infecção por esse agente, gerando perdas econômicas (XIAO-LI *et al.*, 2019; ZHU *et al.* 2017).

Os microorganismos podem ser primários, quando possuem a capacidade de causar a doença em qualquer situação, e podem ser oportunistas, quando não provocam doenças em situações favoráveis (GALLINI, 2019).

A *S. agalactiae* está presente em várias culturas de peixes, como *Schizothorax prenanti*, *Aristichthys nobilis*, *Francisella tularensis*, *Trachinotus ovatus* que é a doença mais presente na China (ZHANG *et al.*, 2019).

Além da infecção por *S. agalactiae*, a indústria produtora de tilápia sofre com mais dois patógenos, *Aeromonas hydrophila* e a *Flavobacterium columnare*. Estes são geralmente conhecidos por infectar tilápias no primeiro mês após a mudança para tanques naturais ou cultura em gaiolas (AMPHAN *et al.*, 2019).

Animais infectados por *S. Agalactiae* apresentam sintomas, como anorexia, natação em espiral, opacidade da córnea, devido a invasão desse agente no cérebro, fígado, baço e rim (XIAO-LI *et al.*, 2019; WANG, 2016).

Atualmente estudos realizados transcriptoma estão sendo utilizados em tilápias-do-nilo com infecção por *S. agalactiae* para buscar mudanças de transcrição de genes que ocorrem após a infecção no baço e no rim (XIAO-LI *et al.*, 2019).

Após a infecção desse agente, muito genes relacionados com o sistema imune já foram encontrados, mostrando uma importante resposta imunológica da tilápia no estágio inicial da infecção por *S. agalactiae* (XIAO-LI *et al.*, 2019).

Devido a sua importância mundial utilizamos a infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo que foram vacinadas, para averiguar se mesmo imunizadas a infecção por esse agente influencia a expressão de genes ligado ao sistema imune.

2.3 Sistema Imune Dos Peixes

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

A função do sistema imune inata é direcionada contra microrganismos e material genético estranho de forma inespecífica, diferente do sistema imune adquirido que ataca antígenos de forma específica, presente em microrganismos, produzindo linfócitos T e anticorpos (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2014). Quando o organismo produz resposta contra agentes infecciosos virais, fúngicos, parasitários ou bacteriano, as chances desse agente invadir e se instalar nesse organismo são muito menores (ELLIS, 2001).

2.4 Sistema Imune Inato Ou Não Específico

O sistema inato é a primeira defesa que o organismo possui, inclui a barreira física da pele e do muco; bem como os componentes celular e humoral (ABREU, 2007; SOUZA *et al.*, 2019). Além dessa primeira barreira, existem vários componentes do sistema imune que estão presentes no organismo antes mesmo que tenha contato com o invasor, formando assim uma primeira barreira de defesa inata (ELLIS, 2001; SOUZA *et al.*, 2019).

O sistema inato tem a função de reconhecer porções que são denominadas PAMPS (*Pathogen associated molecular patterns*) originadas de agente infecciosos ou microrganismos como peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, DNA bacteriano ou RNA viral (VAN BEEK *et al.*, 2006). O reconhecimento desses componentes não próprios do organismo é realizado por receptores denominados PRRs (Pattern recognition receptores), considerados moléculas chaves para emitir alerta do sistema imune frente a invasores (RAUTA *et al.*, 2014). Quando há o reconhecimento entre os PRRs e PAMPS gera uma cascata de sinalização intercelular, estimulando a liberação de diversas citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas IL-1 β , 12, 8, 6 e interferons (IFN) (RAUTA *et al.*, 2014).

O sistema inato nos peixes é considerado mais efetivo quando comparado com outros vertebrados, por possui uma grande diversidade de genes que codificam os PRRs, devido ao fato de existir inúmeras células procarióticas e vírus no ambiente aquático, promovendo uma grande adaptação dos peixes (MAGNADOTTIR, 2006).

Outra parte importante do sistema imune é a presença de células fagocíticas que desempenham um papel importante na regulação do sistema imune, pois elas trabalham conjuntamente com o sistema imune inato e o adquirido (ABREU, 2007).

Existem duas vias de atuação do sistema imune inato: a imunidade humoral que é mediada por moléculas encontradas nos fluidos corpóreos como a lisozima, interferon, lectina e sistema complemento, entre outras, e a imunidade inata mediada por células que estão associadas as células do sistema imune (SHOEMARKER *et al.*, 2001).

2.4.1 Barreiras de defesa

O sistema inato conta com uma barreira física constituída pela pele e muco, formando a primeira linha de defesa contra patógenos. O muco é uma camada viscosa que recobre todo o tecido epitelial dos peixes (GUARDIOLA *et al.*, 2017). Ele é formado por 95% de água e glicoproteínas conjugadas com oligossacarídeos, proporcionando grande adesividade impedindo que os invasores alcancem as células do epitélio (MESTECKY *et al.*). A pele e o muco consistem também em uma barreira química, pois contém citocinas, glicoproteínas, lisozima, imunoglobulinas, proteínas do sistema

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

2.4.2 Componentes do sistema inato humoral

O sistema inato humoral atua através de diversos componentes solúveis nos fluidos corpóreos. O meio aquático possui uma infinita diversidade de agente virais, fúngicos e bacterianos, por esse motivo, os peixes desenvolveram mecanismos contra invasão bacteriana que incluem ativação do sistema complemento, da atividade da lisozima, citocinas e fagocitose (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2014).

Existem também fatores de inibição de crescimento bacteriano que tem como função evitar a propagação da colônia, dentre eles as antiproteases, que são proteínas proteolíticas que atuam sobre bactérias que destroem os tecidos dos peixes, as lisinas, que são peptídeos antibacterianos que atacam as membranas dos patógenos (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2014).

2.4.3 Sistema complemento

Presente no plasma sanguíneo, o sistema complemento, tem papel fundamental no reconhecimento de bactérias e possui a função de lisar as células bacterianas aumentando a atividade fagocítica (ELLIS, 2001). O sistema complemento é composto por proteínas solúveis que realizam a inativação de toxinas liberadas por bactérias e atuam também na mediação do processo inflamatório e na fagocitose (SECOMBES; CHAPPELL, 1996).

A ativação do sistema complemento ocorre por três vias: via alternativa, via lectina e pela via clássica. A ativação do sistema complemento pelo via alternativa acontece através do arranjo do componente C3 na superfície do patógeno, já pela segunda via ocorre pela ligação de proteínas que se ligam à manose e pela via clássica o sistema é ativado pela ligação de imunoglobulinas com os antígenos que

podem ser fungos, bactérias e vírus (GALLANI, 2019; KREUTZ, 2017; SECOMBES; CHAPPELL, 1996).

O C3 é a forma ativa de vários genes e possui uma variedade de isoformas em peixes responsável pela diversidade imunológica. Para que ocorra o funcionamento das três vias, o gene C3 atua mediando a inflamação, atacando membranas de microorganismos, fazendo interações com superfície celular e proteínas estranhas (GALLINI, 2019).

Além do complemento, o plasma conta com vários fatores que inibem o crescimento bacteriano, como a lisozima que ajuda diminuir a taxa de multiplicação de patógenos (ELLIS, 2001).

2.4.4 Lisozima

A lisozima é uma grande aliada do sistema de defesa não específico, devido a sua capacidade de promover proteção contra patógenos. Ela é uma enzima de origem leucocitária que é encontrada principalmente em locais mais suscetíveis à invasão bacteriana (SAURABH; SAHOO, 2008).

É responsável por mediar a proteção dos peixes contra microorganismo, sendo ela um dos principais parâmetros utilizados para avaliar a atividade do sistema imunológico do peixe (GALLINI, 2019)

Em consequência da origem leucocitária, a lisozima é encontrada em maior quantidade no rim cranial, trato digestório e baço devido à alta concentração de leucócitos presente nesses tecidos, que são somente utilizados para análise de expressão gênica (ABREU, 2007; GALLANI, 2019).

Ela está presente no muco, ovos, sangue e em vários tecidos onde existem leucócitos e sua principal atuação é sobre a parede de bactérias gram-positivas e negativas. (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2014).

Existem algumas proteínas que podem estar em elevadas concentrações após a invasão de patógenos ou por algum trauma, tais como C3 do complemento, lisozima, lectina, entre outros. Esses componentes humorais são conhecidos como proteínas de fase aguda e são produzidas em sua maior parte pelo fígado (ABREU, 2007).

Ela possui ação tanto bactérias gram-positivas quanto negativas, é ativadora do sistema complemento, de fagócitos e tem ação opsonizante. Recentemente foi descrita uma nova ação da lisozima que seria ação anti-inflamatória que pode ser notada durante como pós-infecção. (GALLANI, 2019).

Porém, a atividade da lisozima depende de algumas características do organismo, como idade, sexo, pH da água, nível do estresse e presença de imunoestimulantes (SAURABH; SAHOO, 2008).

2.4.5 Imunidade inata mediada por células

Além do sistema humoral, o sistema imune inato conta com as células de defesa orgânica, como os granulócitos, monócitos, macrófagos e células natural killer (ELLIS,1999). Os macrófagos têm a função fundamental de secreção de enzimas lisossomais, do complemento e protaglandinas (URBINATI; CARNEIRO, 2004). Além de atuar na fagocitose, os macrófagos também estão presentes no processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos; e controlam os mecanismos de ação do sistema imune através da secreção de várias citocinas, como interleucina-1 e interferons (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

Em alguns casos, os microrganismos podem sobreviver a essa primeira barreira de defesa e invadir o organismo, causando respostas inflamatórias, atraindo fagócitos (macrófagos e neutrófilos) para destruir esse patógeno (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

A inflamação é outra forma de resposta do sistema inato contra agentes infecciosos, mediada por compostos celulares e humorais. Após a detecção desses agentes, ocorre a migração de células de defesa através da dilatação dos capilares (MAGNADOTTIR, 2006).

2.5 Sistema Adquirido Ou Específico De Defesa

O sistema específico encontra-se em todos os vertebrados com exceção dos peixes da classe Agnatha (HOLLAND; LAMBRIS, 2002). O sistema adquirido é capaz de reconhecer, reagir e distinguir diversas substâncias, incluindo moléculas com muita semelhança, e gerar memória imunológica (ABBAS; LICHMAN 2004). Diferentemente do sistema imune inato, o sistema imune específico necessita da presença do antígeno para desencadear reações que resultarão no aumento de anticorpos específicos para tais invasores, promovendo ainda memória imunológica (BERNSTEIN *et al.*, 1998).

Após o reconhecimento do agente invasor pelo sistema imune inato, algumas células apresentadoras de antígenos (CAA) conhecidas como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B transformam os invasores em partículas, desencadeando uma resposta imune (ABBAS; LICHMAN, 2004).

O linfócito T reconhece o material antigênico somente na presença de componentes humorais específicos denominados de moléculas de histocompatibilidade. Essas moléculas contêm um complexo de receptores glicoproteicos chamado de complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (ABBAS; LICHMAN, 2004). As moléculas de MHC são divididas em classe I e II. As moléculas de classe I estimulam a apresentação de antígenos derivados de peptídeos endógenos (células tumorais ou agente intracelular) para os linfócitos e ligam-se as células T citotóxicas (glicoproteína CD8) (KLEIN *et al.*, 2007) enquanto as moléculas de classe II promovem a apresentação de antígenos derivados de peptídeos exógenos (bactérias, vírus, parasitas e fungos) a estes linfócitos e ligam-se as células T auxiliares (glicoproteínas CD4) (KLEIN *et al.*, 2007).

As respostas do organismo frente a um patógeno são influenciadas pela ligação e apresentação do antígeno para as células, pois as moléculas do MHC não apresentam especificidade, sendo assim, cada molécula do complexo pode ligar-se com vários tipos de antígenos (KLEIN *et al.*, 2007). Depois do reconhecimento, são liberadas citocinas que atuam ativando outras células, tais como macrófagos, linfócitos B e outras células fazem a eliminação do microrganismo através da fagocitose (ELLIS, 2001).

Na busca da preservação da vida, sistema imune inato e o específico trabalham de forma conjunta frente ao um organismo invasor (SECOMBES; CHAPPELL, 1996). As células T possuem a função de ativar células de defesas como linfócitos B, linfócitos citotóxicos e macrófagos, através da liberação de citocina no organismo. Depois de ativados, os linfócitos B produzem anticorpos que ligam-se ao microrganismo, iniciando assim a fagocitose, promovendo a neutralização e opsonização do agente (ROBI *et al.*, 2003). A ativação dessas células demonstra que os sistemas inato e específico atuam simultaneamente ou isoladamente frente à ameaça de um invasor (GOLDSBY *et al.*, 2002).

2.6 Citocinas

As citocinas são componentes essenciais na comunicação do sistema imune e regulação de respostas de defesa (AROSA e CARDOSO, 2012). Em peixes, o sequenciamento e análise de expressão gênica de citocinas são alvo de diversos estudos. São produzidas por leucócitos e liberadas no meio extracelular. Elas são divididas em famílias, tais como interferon (IFN) interleucinas (IL), quimiocinas, fatores de estimulação de colônias (CFS) e fator de necrose tumoral (TNF) (SAVANet *et al.*, 2003).

Entres as categorias, as interleucinas sobressaem entre as outras por suas características imunorreguladoras, além de atuarem na supressão e estímulo do sistema imunológico (GALLANI, 2019).

Dentre a literatura é possível encontrar inúmeras interleucinas descritas, só a família da IL-1 possui mais de 11 descritos em mamíferos. Em peixes, uma das mais conhecidas é IL-1 β que é pró-inflamatória. Já na família da classe II das citocinas, encontramos a IL-10 que é um citocina anti-inflamatória.

Os principais avanços sobre os genes de citocinas de peixe foram obtidos no baiacu e peixe-zebra, realizado pelo projeto “genômica comparativa” (XIAO-LI *et al.*, 2019).

Em resumo, as citocinas são produzidas após a invasão do patógeno e impulsionam sinais inflamatórios que regulam a estadia do residente e depois ativam fagócitos para destruir o patógeno (XIAO-LI *et al.*, 2019).

Algumas citocinas inflamatórias, como TNF- α (tumour Necrosis Factor- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) são responsáveis em ativar celular T e B (VIZONI *et. al.*, 2008; WEI *et al.*, 2018).

Algumas células de defesa, como macrófagos e células dendríticas liberam citocinas que ativam os fagócitos para realizarem sua função de fagocitar (ABREU, 2007). Além disso, as citocinas estão envolvidas nos mecanismos de defesa contra a invasão bacteriana através do processo de inflamação, pois são liberadas pelo tecido lesado citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias, que atuam para diminuir o processo inflamatório. Elas também estão presentes na hematopoese, pois elas atuam como receptores fazendo todo o controle celular de proliferação, diferenciação, maturação e função (BILLER-TAKAHASHI, 2014)

A IL-1 β e a TNF- α são citocinas importantes para a manutenção da resposta do sistema imune, por isso vários estudos estão sendo feitos através de sua expressão para estudar as variações na resposta imune (DAWOOD *et al.*, 2020).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que aumenta os efeitos antibacterianos nas células hospedeiras e também a fagocitose. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que é ativada para diminuir os efeitos da inflamação após a invasão no animal por algum patógeno (ABDELHAMID; ELSHOPAKEY, 2020).

O estudo das interleucinas é algo bem complexo, pois existe uma variedade de interleucinas e cada uma com diversas funções e características gênicas, por esse motivo é importante estudar melhor as citocinas para entender melhor seu funcionamento.

2.7 Genes Do Sistema Imune

O crescimento da piscicultura tem gerado inúmeras pesquisas associadas a genética e a imunidade para aprimorar a produção de peixes. Estas buscam entender o mecanismo do sistema imune frente ao desafio de um patógeno, para tentar criar medias para mitigar a perca econômica (GALLANI, 2019).

Para tanto, alguns genes têm sido muito estudado devido sua importância para o funcionamento do sistema imune, dentre eles estão: lisozima, proteína chave do sistema complemento (C3 e C4), proteína de choque térmico 70kb (HSp70), interleucina 10 (IL-10), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12), fator de necrose tumoral(TNF- α), interferon (IFN) (GALLANI, 2019).

A interleucina 6 se destaca nos estudos gênicos devido sua função na regulação celular, diferenciação de células T e produção de imunoglobulinas. A TNF- α é bastante estudada por estar envolvida em inflamações sistêmicas e na regulação das células imunes (HONG *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2012) Os TNFs possuem elevada atividade antiviral e são muito estudados em regiões que possuem o clima frio (ZOU; SECOMBES, 2011).

A expressão do gene C3 é de extrema importância, pois ele tem a função de regulação das proteínas centrais do sistema complemento, sendo ele importante contra ação de microorganismos. O gene da lisozima atua tanto em infecções bacterianas quanto parasitárias (PENG *et al.*, 2017; CARBALLO *et al.*, 2017)

A IL-10 é a principal citocina anti-inflamatória, que tem a função de limitar a inflamação através da regulação das células imunes, diferente da IL-1 β que é uma citocina pró-inflamatória que permite a iniciação do processo inflamatório (KARAN *et al.*, 2016)

Para o presente estudo, oito genes incluindo citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL10), peptídeos antimicrobianos, tais como: lisozima (Lys), do sistema complemento C3, Hsp70 e um anticorpo IgM, foram escolhidos para serem avaliados se há influência da suplementação da dieta com o β -glucano na expressão dos genes no rim cranial e no baço de tilápias-do-Nilo.

2.8 Anticorpos

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são expressas na membrana do linfócito B ou secretadas pelos plasmócitos (linfócitos B ativados) (GOLDSBY *et al.*, 2002). Diferente dos mamíferos, nos peixes a imunoglobulina prevalente é a IgM que é uma proteína com sítios para reconhecimento do antígeno, mas também são encontradas

outras imunoglobulinas, tais como IgD, IgZ e a IgT (HIRONO *et al.*, 2003; DANILOVA *et al.*, 2005; HANSEN *et al.*, 2005). Elas podem ser encontradas no soro, muco e no trato gastrointestinal (DAVIDSON *et al.*, 1993).

Durante o desenvolvimento da célula B, são formados os receptores antigênicos dos anticorpos, formando um rearranjo gênico ordenado, onde são selecionados de acordo com a afinidade de ligação ao antígeno, caso a afinidade seja baixa, as células morrem ou deixam células de memória (TIZARD, 2002).

Os anticorpos estão presente no sistema digestório, brânquias e pele, lugares específicos para evitar a adesão de bactérias na superfície celular (ELLIS, 2001). Alguns sistemas dependem dos anticorpos para serem ativados, tais como o sistema de complemento que é ativado pela via clássica e promove a estruturação de proteínas na parede celular de patógenos, gerando danos nas membranas (ELLIS, 2001).

A quantidade de anticorpos presente no organismo pode variar de acordo com a espécie, maturidade sexual e idade, porém com a presença do antígeno, pela imunização artificial, motiva o aumento das concentrações dos anticorpos no soro (HORDVIK, 2002; ROSS *et al.*, 1998).

2.9 Tecidos E Órgãos Do Sistema Imune

Diferente dos mamíferos, os peixes não possuem medula óssea, mas sim, tecidos que apresentam função imuno-endócrina que são responsáveis pelo sistema imunológico nos peixes, tais como, tecidos mieloides e linfoides, rim, timo e baço (PRESS; EVENSEN, 1999; ABREU, 2007).

O rim é um dos órgãos essenciais para o sistema imune, desempenha papel fundamental nos peixes, e poderia ser comparado com a medula óssea nos mamíferos (MESEGUER *et al.*, 1994), uma vez que a formação, maturação e diferenciação de células sanguíneas ocorrem nesse tecido. Além disso, são encontrados agregados de células reticulares, macrófagos e linfócitos, que estão relacionados à captura de antígeno e à memória imune (BRATTGJERD; EVENSEN, 1996). No peixe adulto, a porção anterior do rim é a mais importante, pois há uma

grande concentração de células de defesa, onde acontece a produção e diferenciação das células, como de leucócitos, granulócitos, linfócitos B, monócitos e macrófagos (TORROBA; ZAPATA, 2003).

Outro órgão importante no sistema imune é o baço, onde os antígenos permanecem retidos para o seu processamento e apresentação para o linfócito T (SOLEM, 2006). Esse órgão nos peixes assemelha aos mamíferos, pois nos mamíferos ele é dividido em polpa branca responsável pela hematopoese, e polpa vermelha pela fagocitose celular (PRESS; EVENSEN, 1999).

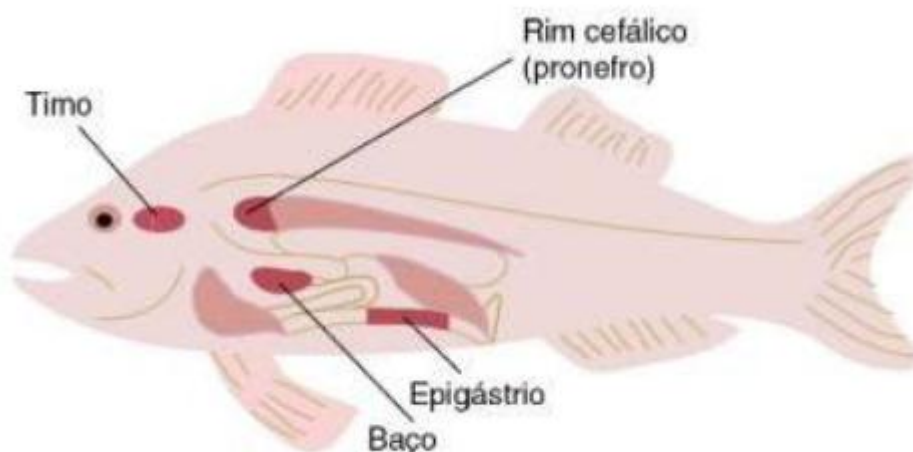
Na literatura, o baço nos peixes tem alta capacidade de produção de anticorpo e possui a função de armazená-los, mas também está relacionado com reativação de células B de memória em tilápias (ETO *et al.*, 2018)

O timo é um órgão duplo que está localizado atrás do opérculo sendo considerado um importante local para o desenvolvimento e maturação de linfócitos T, embora ocorra a involução desse órgão em peixes adultos, mas pode variar de acordo com a espécie (TORROBA; ZAPATA, 2003).

O fígado tem a função de produzir proteínas da resposta inflamatória e do sistema de complemento, apresentando assim as mesmas funções observadas em mamíferos (DALMO, 1997). Outra estrutura aliada aos tecidos linfoides são as mucosas do trato gastrointestinal, brânquias e pele. No muco produzido por esses tecidos existem diversos componentes do sistema inato de defesa como, lisozima, imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento (DALMO, 1997).

Abaixo na (Figura 1) pode-se observar todos os tecidos linfoides do peixe, os quais regulam o sistema imunológico.

Figura1 - Tecidos linfoides dos peixes composto pelo timo, rim cranial ou cefálico, baço e epigastro.



Fonte: Tizard (2014). Adaptado por Rodrigues (2020).

2.7 Células Inatas e Do Sistema Adquirido

O rim, timo, baço e tecidos mieloides são responsáveis em produzir células de defesa do sistema imune inato (macrófagos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos, células *natural killer*, fatores solúveis, tais como, lisozima, proteínas do sistema complemento, entre outros (CRUVIEL *et al.*, 2010) e no sistema imune adquirido são responsáveis em produzir CAAS (macrófagos, células dendríticas, células natural killer e linfócitos T e B).

No processo inflamatório os macrófagos potencializam a ativação de linfócitos e através da expressão de moléculas liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas (CRUVIEL *et al.*, 2010). Outras células que são importantes na defesa inespecífica são as células *Natural Killer* (NK), que têm papel fundamental no reconhecimento e rompimento de células infectadas por patógenos, e são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos, ativação de células dendríticas e linfócitos T e B (CRUVIEL *et al.*, 2010).

As células dendríticas são responsáveis por fazer uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, através da captura e apresentação de antígenos para os linfócitos, além de atuarem na inflamação e são decisivas para determinar a ativação e o tipo de imunidade mediada pelos linfócitos (CRUVIEL *et al.*, 2010)

Os neutrófilos são leucócitos essenciais nos processos de inflamação e são ativados por estímulos, como contato bacterianos, quimiocinas e citoxinas. Além disso esses leucócitos possuem a função fagocitária e sobre degranulação, liberando grânulos no meio extracelular (CRUVIEL *et al.*, 2010).

Os monócitos são células imaturas que constituem até 8% dos leucócitos e que dão origem aos macrófagos. Eles são fagócitos que englobam, processando microrganismos e apresentam antígenos estimulando a resposta mediada por linfócitos (CRUVIEL *et al.*, 2010).

Os basófilos são leucócitos, que constituem cerca de menos de 1% dos leucócitos do sangue periférico e podem ser recrutados para sítios inflamatórios em conjunto com eosinófilos (CRUVIEL *et al.*, 2010).

Os eosinófilos são granulócitos importantes no processo de infecção parasitária e reações alérgicas por moléculas de adesão e quimiocinas. Quando ativados, induzem a inflamação e liberam os conteúdos dos grânulos que contém proteínas básicas, proteínas catiônicas, neurotoxina e peroxidase eosinofílica (CRUVIEL *et al.*, 2010).

Os linfócitos B são produzidos principalmente pelo rim cranial e eles produzem até 50% de todas as células sanguíneas que pode variar de acordo com a espécie de peixe (HANSEN *et al.*, 2005).

Eles são responsáveis em expressar moléculas específicas nas suas membranas que são denominados anticorpos que podem se tornar células de memória ou se diferenciar em outro tipo celular, tais como plasmócitos células derivadas da maturação do linfócito B e que produzem imunoglobulinas (ZHAO *et al.*, 2008).

Os linfócitos T são produzidos principalmente pelo timo e como o linfócito B, ao entrar em contato com o agente invasor, pode se diferenciar em células auxiliares, citotóxicas e de memória, sendo os de memória responsáveis em responder a uma segunda invasão. Eles têm papel fundamental nas respostas específicas por atuarem sobre macrófagos promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio (TIZARD, 2002).

Os linfócitos T auxiliares contêm receptores para reconhecer antígenos específicos, porém isso só acontece quando esses antígenos são processados por células apresentadores de antígenos e ligados a um agente facilitador, no caso MHC de classe 2 (TIZARD, 2002).

Já os linfócitos T citotóxicos são responsáveis na defesa do sistema imune contra microrganismos intracelulares (bactérias e vírus) e células tumorais, através da apoptose para evitar disseminação do agente pelas células vizinhas (TIZARD, 2002), porém eles necessitam de facilitadores MHC de classe 1 para fazer o reconhecimento do antígeno para assim, promover a morte celular do invasor (GOLDSBY *et al.*, 2002).

Assim, existe uma relação do sistema inato com adquirido que é realizado pelas células de defesa do organismo (células dendríticas e macrófagos), que após a destruição, apresenta o agente invasor, com auxílio do MHC classe 2, para linfócito T, desencadeando uma resposta adquirida mediada por células (TIZARD, 2002).

Os órgãos são do sistema circulatório para realizar suas funções, pois ele possui substâncias indispensáveis para que o organismo funcione num completo equilíbrio (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Ele estende-se por todo o corpo do animal, irrigando todos os tecidos orgânico, com exceção do epitelial e cartilaginoso (PAIVA *et al.*, 2013). O sangue é um tecido líquido, móvel e que tem a função de transportar gases respiratório, nutrientes e regular a pressão osmótica, pH, temperatura e níveis de hormônio. Através dele, podemos obter informações fisiológicas e, bioquímicas sobre o estado do organismo (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

O sangue é composto por células vermelhas, hemácias e hemoglobina, que são responsáveis pelas trocas gasosas no organismo. Através dele que é possível realizar análises dos parâmetros hematiméticos (CUESTA *et al.* 2002, ISPIR; DORUCU, 2005).

Além das células vermelhas, o sangue é composto por células brancas que são células do sistema imune, os leucócitos e trombócitos, que fazem a defesa desses organismos contra agente invasores (ANDERSON *et al.*, 1992)

Assim como qualquer outro vertebrado, nos peixes, a quantidade e a proporção das diferentes células no sangue evidenciam o estado fisiológico do organismo durante esse período de vida (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Para assegurar a sobrevivência no ambiente aquático, os peixes desenvolveram inúmeras estratégias adaptativas para suportarem extremas variações de temperatura, pressão, pH e outros. Uma dessas adaptações é utilizar órgãos diferentes para produzir células sanguíneas, quando o órgão principal está afetado por alguma enfermidade (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Variações nos elementos sanguíneos dependem de fatores endógenos como sexo, peso, comprimento, estado nutricional e doenças, bem como de fatores

externos, tais como: temperatura, ciclo sazonal, estresse, poluentes e entre outros. (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Outro fato que também prejudica a piscicultura é a produção intensiva, já que devido ao manejo inadequado acaba gerando estresse, imunossuprimindo esses animal. Para tentar mitigar esse cenário as imunostimulantes podem atuar sobre o sistema imune, potencializando a produção das células de defesa (SOUZA, 2010).

2.8 β -Glucano

Os β -glucanos são formados de polissacarídeos naturais que são elementos fundamentais da parede celular e que podem servir como armazenamento de energia em bactérias, fungos, leveduras, algas e plantas (STIER *et al.*, 2014).

São formados por monômeros de D-glicose e na maioria dos casos exibem uma espinha dorsal, com cadeira laterais de D-glicose que fazem ligações (1,3) – β ou (1,6) – β , que determinam sua efetividade como imunomoduladores, pois facilitam a estimulação dos mecanismos de defesa não específica dos animais (STIER *et al.*, 2014; FIGUEIRAS *et al.*, 1998).

Os estudos dos β -glucanos tiveram início no século passado, quando observaram o efeito imunomodulador de uma fração insolúvel em leveduras. Depois desse acontecimento, foram encontrados não só efeitos na saúde de humanos, mas também em roedores, invertebrados e em peixes (NOVAK; VETVICKA, 2008).

De acordo com estudos, os imunostimulantes podem gerar respostas positivas mesmo quando utilizados isoladamente, aumentando a atividade de mecanismos de defesa não específicos, como potencialização das células fagocíticas ou potencialização das células citotóxicas (ANDERSON, 1992).

Por esse e outros motivos, diversos produtos utilizando o β -glucano como base estão sendo desenvolvidos para aumentar a produtividade e a imunidade dos peixes presentes na produção (WHITTINGTON *et al.*, 2005).

Quando há alguma invasão por patógeno no organismo, os macrófagos processam o β -glucano em fragmentos menores que são capazes de ligar-se às

células por receptores O β -glucano tem a função de auxiliar na ativação de células imunes inatas, para uma resposta contra um estímulo indesejável (STIER *et al.*, 2014).

Além disso, aumenta a concentração de proteínas líticas, como lisozima e as do sistema complemento (ESTEBAN *et al.*, 2000).

Ele pode ser administrado de diversas formas, tais como, por injeção, suplementado na dieta e até por imersão na água, sendo que os efeitos imunoestimulantes do β -glucano continuam semelhantes até mesmo em espécies diferentes (PETIT; WIEGERTJES, 2016).

Quando administrado em dietas para animais, o β -glucano é considerado um PAMP (Pathogen associated molecular patterns), pois é reconhecido por receptores, fagocitado e processado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (GOODRIDGE *et al.*, 2011). A fagocitose é um mecanismo essencial para a destruição de patógenos como também para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são fundamentais na destruição de invasores (PETIT; WIEGERTJES, 2016).

São usados também diversos vegetais que possuem ações imunoestimuladora como: babosa (*Aloe Barbadensis*) linhaça (*Linum usitatissimum*), alho (*Allium sativum*), entre outros (RODRIGUES *et al.*, 2020).

As plantas, são atualmente fontes importantes para o tratamento de doenças em peixes, pois há grande disponibilidade, amplo potencial de ação, baixo custo e são biodegradáveis. (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Por tanto, a utilização de imunoestimulantes na piscicultura é bastante importante para mitigar os efeitos de manejos que causam estresse nos animais, como transporte, transferência e vacinação. Além disso, também são indicados para usona larviculturas e alevinagem que são fases, nas quais o peixe fica mais suscetível a doenças (RODRIGUES *et al.*, 2020; HARIKRISHMAN *et al.*, 2011).

O β -glucano se mostrou positivo na redução da concentração de cortisol, o que indica que a suplementação desse produto pode servir como redutor das respostas de estresse (GARCIA, 2004).

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

A administração dos imunoestimulantes na piscicultura pode ser por via oral, injeção ou imersão, sendo a injeção intraperitória é a mais eficiente, porém a que mais

causa estresse. A mais utilizada é o método via oral que permite quase todos os peixes sejam tratados sem que haja outros efeitos prejudiciais (SHAKYA; LABH, 2014; PETIT e WIEGERTJES, 2016).

Abaixo RODRIGUES *et al.*(2020) reportaram a utilização de quimioterápicos, vacinas e imunostimulantes em comparação da eficiência espectro e duração (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre quimioterápicos, vacinas e imunostimulantes
(RODRIGUES *et al.*, 2020 adaptado de SAKAI, 199)

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

Fonte: Elaborado pela autora.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do β -glucano em tilápia- dornillo vacinadas e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* inativadas sobre a imunidade, pela expressão de genes das interleucinas 1 beta (IL-1 β), (IL-6), (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α), imunoglobulina M (IgM), proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons (Hsp70), lisozima (Lys) e C3 do complemento em baço e em rim cranial.

3.1 Objetivos Específicos

(I) Avaliar se o β -glucano promove proteção mais duradoura, avaliada pelo desafio pós vacinação em tilápias;

(II) Avaliar se há interação benéfica entre a administração do β -glucano e a vacinação em tilápias;

(III) Avaliar se há efeito do β -glucano sobre a expressão de genes do sistema imune de tilápias;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições Do Biotério

Foram utilizadas 24 caixas de polietileno, cobertas tampadas com telas impedindo escape dos peixes. 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 preciso cobrir as janelas e fazer a instalação de luminárias para que todas as caixas tivessem acesso às 12h no período diurno e noturno.

Foram utilizados termostatos para manter a temperatura constante de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ para que não houvesse influência no desempenho alimentar dos peixes. O oxigênio dissolvido e pH foram medidos pelo oxímetro YSI ProDO 7, $10 \pm 0,5$ mg e pH 7,5-7,8.

4.2 Animais

Para realizar o experimento foram utilizadas 432 tilápias-do-nilo juvenis, revertidas, provenientes de piscicultura da região de Santa Fé do Sul - SP, com o peso inicial médio de 80g. Os peixes foram distribuídos em 24 caixas (18 peixes/caixa) e alimentados com dieta comercial durante o período de aclimação que iniciou em 01 de abril de 2020 e terminou no dia 21 de abril de 2020. Após o período de aclimação, o experimento foi iniciado no dia 22 de abril e terminou em 18 de junho de 2020.

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

4.3 Dieta

Para o experimento, foram confeccionadas duas dietas: Uma dieta controle (livre de β -glucano) e uma dieta experimental (0,1% de β -glucano), preparadas no Instituto de Pesca de São José do Rio Preto – SP e formuladas de acordo com as exigências da espécie (Tabela 2).

As dietas foram feitas com alimentos pesados, pré-misturados e moídos em triturador tipo martelo com peneira de 0,8 mm, aos quais foram incluídos os suplementos minerais. Em seguida, foi incorporado na dieta experimental, 0,1% de β -glucano. A mistura foi umedecida com água a 50°C e submetida ao processo de extrusão com matrizes de 2,5 mm e, posteriormente, seca em estufa de ventilação forçada por 12 horas a 55°C, resultando em um produto com cerca de 10% de umidade.

As dietas foram armazenadas em potes plásticos e conservados em geladeira durante todo o experimento.

Os peixes foram alimentados durante 60 dias com as dietas experimentais balanceadas na proporção de 3% do peso corporal por dia.

Tabela 2 - Formulação da ração da dieta controle e com β -glucano

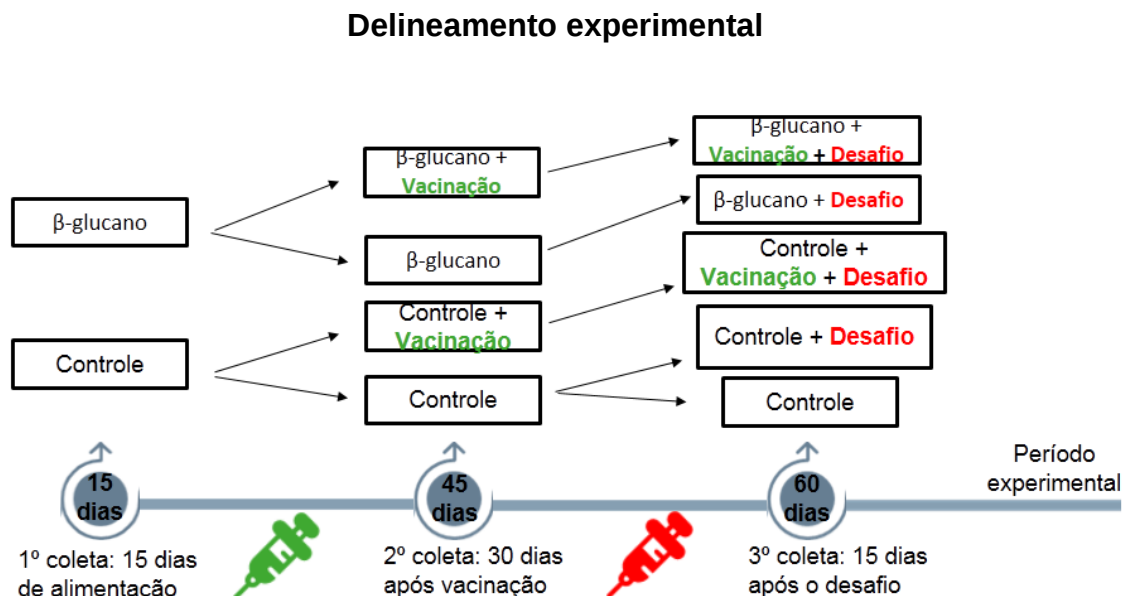
Ração Basal		
Matérias Primas		
Descrição	(%)	(%)
	Controle	Teste- β -Glucano
Farelo de Soja	34,218	34,218
Farinha de vísceras	18,000	18,000
Milho	17,511	17,511
Farelo de Trigo	9,000	9,000
Quirera de arroz	8,000	8,000
Farinha de Carne e ossos	6,686	6,686
Protenose	3,446	3,446
Fosfato bicálcico	0,755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

Fonte:Elaborado Pela Autora.

4.4 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 11 tratamentos, descritos na Figura 3, e foi delineado para avaliar a associação entre a administração de β -glucano, vacinação e desafio com bacterina. Inicialmente peixes foram divididos em 2 grupos, Controle e β -glucano (12 caixas cada grupo), e receberam as respectivas dietas por 15 dias, e passaram por amostragem (1 peixe de cada caixa, n=12) Em seguida foram subdivididos em 4 grupos (6 caixas de cada grupo), 2 grupos passaram por vacinação (3 caixas do grupo controle e 3 do alimentado com β -glucano). Receberam mais 15 dias de alimentação controle ou suplementada com β -glucano e foram amostrados aos 45 dias de experimento (30 dias após vacinação). Em seguida, peixes de todas as caixas passaram por desafio por bacterina de *S. agalactiae*, exceto 3 caixas do subgrupo controle (controle não vacinado e não desafiado). Foram realizadas amostragens em 3 tempos: 15 dias de experimento, 30 dias após vacinação e 15 dias após o desafio com bacterina de *S. agalactiae*.

Figura 3 - Cronograma do experimento para visualização dos grupos e tratamentos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tratamento 1: Alimentação com dieta controle durante 15 dias seguida de amostragem

Tratamento 2: Alimentação com β-glucano durante 15 dias seguida de amostragem.

Tratamento 3: Alimentação com dieta controle durante 45 dias seguida de amostragem.

Tratamento 4: Alimentação com dieta controle durante 45 dias, com imunização com vacina comercial (AquaVac® STREP SA, MSD) aos 15 dias de experimento, e amostragem aos 45 dias de experimento.

Tratamento 5: Alimentação por 30 dias com β-glucano e 15 dias com dieta controle e amostradas aos 45 dias.

Tratamento 6: Alimentados por 30 dias com β-glucano e 15 dias com dieta controle, com imunização com vacina comercial (AquaVac® STREP SA, MSD) aos 15 dias de experimento, e amostragem aos 45 dias de experimento.

Tratamento 7: Alimentadas com dieta controle durante 60 dias seguida de amostragem.

Tratamento 8: Alimentadas com dieta controle durante 60 dias, seguido de desafio com *S. agalactiae* inativada aos 45 dias de experimento e amostragem aos 60 dias.

Tratamento 9: Alimentação com dieta controle durante 60 dias com imunização com vacina comercial (AquaVac® STREP SA, MSD) aos 15 dias de experimento, seguido do desafio com *S. agalactiae* inativada aos 45 dias de experimento, e amostradas aos 60 dias.

Tratamento 10: Alimentação por 30 dias com β -glucano e 30 dias com dieta controle, seguido do desafio com *S. agalactiae* inativada aos 45 dias de experimento e amostragem aos 60 dias de experimento.

Tratamento 11: Alimentação por 30 dias β -glucano durante 30 dias e 30 dias com dieta controle, com imunização com vacina comercial (AquaVac® STREP SA, MSD) aos 15 dias de experimento, seguido do desafio com *S. agalactiae* inativada aos 45 dias e amostragem aos 60 dias.

As amostragens foram realizadas aos 15 dias de alimentação, 30 dias após vacinação e 15 dias após o desafio com *S. agalactiae* inativada. Na figura 1 estão representados os tratamentos e cronograma de amostragens.

Aos 15 dias foram amostrados 12 peixes (n=12) do tratamento que recebeu a dieta controle e 12 peixes alimentados com β -glucano, anestesiados em solução de óleo de cravo ($1\text{g } 10\text{L}^{-1}$ de água), individualmente pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01g, medidos em ictiômetro para coleta de dados, e sacrificados para retirada do rim cranial e o baço para avaliação da expressão dos genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, HSP70, IgM, C3 e Lys por qPCR RealTime.

Após a primeira coleta, os peixes dos tratamentos 4 e 5 foram imunizados com vacina comercial (AquaVac® STREP SA, MSD, São Paulo, Brasil) através de injeção intraperitoneal. Após 30 dias da imunização, foi realizada a segunda coleta, como descrito acima, e em seguida foi realizado o desafio com *S. agalactiae* inativada nos tratamentos 8, 9, 10 e 11.

Após 15 dias do desafio, foi realizada a última coleta, como descrito acima, de 12 peixes por tratamento para avaliação das análises citadas. O rim cranial e o baço foram armazenados em freezer -80°C até a realização das análises.

4.3 Realização do desafio com *S. agalactiae* inativada (bacterina)

Para a fase final do experimento, foi desenvolvido um protocolo de desafio microbiológico com *S. agalactiae* pelo Laboratório de Imunologia Animal –(LIA)-UNESP Dracena, SP. As bactérias foram adquiridas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (LAPOA-CAUNESP), cujas cepas foram isoladas e identificadas em peixes a partir de sinais clínicos do animal doente.

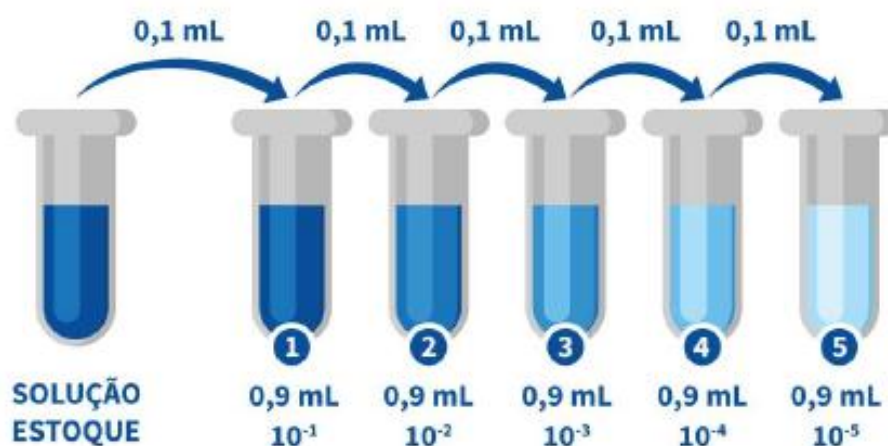
O peixe moribundo passou por assepsia com álcool 70% para coletar o rim cranial e cérebro. Os tecidos foram incubados por 24-48h à 28°C e semeados em placas de cultura contendo ágar BHI apropriado para isolar a bactéria e caracterizado morfológicamente com coloração gram. Foi realizada análise molecular para identificação da espécie e o teste de sensibilidade microbiana para achar a concentração mínima inibitória e mínima bactericida

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

Para a realização do desafio, utilizou-se as bactérias que cresceram em meio de cultivo BHI, em densidade ótica alta, em torno de 2 (Leitura em 625nm) que passaram por inativação. A inativação das bactérias foi feita por aquecimento em garrafa em banho maria à 50 °C por 30 min e em seguida, lavadas com PBS 1x e ajustada a OD para 0,37, que representa a DL50 em uma concentração de $1,3 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹, determinado previamente por estudo realizados pelo LAPOA.

Entretanto para verificação da concentração utilizada, foi realizado plaqueamento do meio de cultivo para contagem das UFCs utilizadas. Para isso, o meio de cultivo utilizado passou por diluição seriada e foi semeado em placa com meio sólido PCA (Figura 4).

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



Fonte: Laboratório de Imunologia Animal, (2020)

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

Por último, foi feita a injeção intraperitoneal individualmente de 100 μL por 10g de peso vivo de suspensão de *S. agalactiae* inativada na concentração de $1,3 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹ na cavidade pélvica dos peixes dos tratamentos 8, 10, 11.

Diversos estudos apresentam desafios com a bactéria atenuada ou viva, mas apresentam alta mortalidade. Neste caso, foi realizado com a bactéria inativada para avaliar se houve a potencialização da resposta imunológica dos peixes através de uma terceira coleta.

4.7 Extração De RNAe Construção De Biblioteca De cDNA

Os tecidos foram coletados e armazenados – 80°C para ser realizado a análise do transcriptoma de citocinas e anticorpo IL-1 β , IL-6, TNF- α , HSP70, IgM, IL-10, C-Lys e do sistema complemento C3 por qPCR em Real Time.

Para a extração de RNA foi utilizado 1 ml de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™) e 200 μ L de clorofórmio, no qual, os tecidos foram adicionados e homogeneizados. Foram centrifugados a 12.000 x g durante 15 minutos (4°C). A parte superior aquosa foi transferida para outro microtubo onde foi adicionado o isopropanol. A amostra foi agitada com vórtex e centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos (4°C). Por fim, os sobrenadantes foram descartados, os pellets de RNA foram lavados três vezes com 100 μ L de etanol, centrifugados, descartados os sobrenadantes e os pellets foram deixados secar por 15 minutos, sendo, em seguida, suspensos com água molecular.

Após o isolamento do RNA, foi feita a quantificação por absorbância a 260 nm em ng utilizando o Nanodrop-1000 (Thermo Scientific). Uma alíquota de RNA foi processada em gel de agarose a 1% e pós-corada com GelRed® (Sigma) para verificar a integridade do RNA.

A partir do RNA extraído foi construída a biblioteca de cDNA, por transcrição reversa (RT) usando 1 mg de RNA total e iScript™ III (Life Technologies). O cDNA resultante foi armazenado a -20°C até o uso. Em seguida, a sequência foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers alvos (selecionados em literatura para a espécie *Oreochromis niloticus*).

4.4 Determinação Molecular Da Expressão De Genes

A determinação molecular da expressão de genes foi realizada pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR-RT) e os resultados foram analisados por quantificação relativa pelo método 2 – $\Delta\Delta C_t$ (PFAFFL, 2004).

Essa técnica fornece resultados da quantificação rápida e fidedigna, além de ser amplamente utilizada na medicina molecular e na biotecnologia (PFAFFL, 2004; REBOUÇAS *et al.*, 2013).

A qPCR-RT fornece informações sobre a expressão gênica de diferentes fontes e amostras, além de possuir vantagens como sensibilidade, precisão na quantificação

de transcritos de mRNA, rapidez na reação e baixo custo dos reagentes (REBOUÇAS *et al.*, 2013). A reação consiste em desnaturação e separação da fita dupla do DNA, associação dos primers a uma única cadeia e síntese da fita complementar, catalisada pela DNA polimerase (REBOUÇAS *et al.*, 2013).

Diferente da PCR convencional, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR-RT) consegue amplificar e quantificar conjuntamente uma região da molécula do DNA. Além disso na PCR convencional utiliza-se a eletroforese para avaliar o produto da amplificação, distintamente do qPCR-RT que utiliza moléculas fluorescentes nas reações, possibilitando a quantificação do amplicon (REBOUÇAS *et al.*, 2013). Entretanto devido à instabilidade do material, deve-se confirmar a eficiência dos genes alvo e dos primers. Por isso é recomendado uma normalização do gene alvo (gene produção regulada) com o de referência (gene de produção constitutiva ou de manutenção/ housekeeping) (PFAFFL, 2004).

Existem diversos fatores que podem causar disparidades na quantificação e qualidade do mRNA. Esses erros podem ser tanto na pipetagem quando na escolha do protocolo para fazer a extração do RNA. Porém existem diversas estratégias que podem normalizar o qPCR em tempo real (REBOUÇAS *et al.*, 2013).

Para obter uma ótima eficiência na reação é preciso levar em consideração a temperatura de fusão dos primers, especialmente da hibridização e o comprimento dos amplicons, que são de amplificação da dupla fita delimitado pelos primers (REBOUÇAS *et al.*, 2013).

Os genes de referência ou manutenção (housekeeping) podem ser utilizados como normalizadores da qPCR-RT, pois eles são expressos em células e tecidos, e não apresentam alterações na sua expressão, mesmo sob condições experimentais (REBOUÇAS *et al.*, 2013). Os housekeeping estão presentes em todas as células nucleadas, visto que são necessários para a sobrevivência das células básicas, sendo assim a síntese de mRNA é segura e estável em vários tecidos, mesmo sob experimentos (PFAFFL, 2004). Os housekeeping mais encontrados na literatura são gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), β -actina, proteínas ribossomais (RPL), ubiquitina (UBQ), β -tubulina, proteína ribossomal 18S (18S rRNA) e fosfoglicerato quinase (PGK) (REBOUÇAS *et al.*, 2013).

As reações para qPCR foram realizadas em placas de 96 poços usando iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante com reações individuais de 20 μ l consistindo em 10

μl de mistura principal de PCR SYBRGreen (2x), 8μl de iniciadores 200 nM e 2 μl de molde de cDNA. O SYBRGreen é um corante que se liga ao DNA de fita dupla e emite luz durante a reação. Conforme os ciclos, os produtos da PCR vão acumulando e a fluorescência vai aumentando proporcionalmente a quantidade de DNA específico presente na amostra (REBOUÇAS *et al.*, 2013). A partir da amplificação, o SYBRGreen associa-se ao DNA de fita dupla recém-sintetizado, então a fluorescência aumenta constantemente no comprimento de onda específico que é medido após cada ciclo (Ct) (REBOUÇAS *et al.*, 2013).

Todas as reações foram realizadas no Sistema de detecção de qPCR em tempo real iCycler iQ™ (Bio-Rad Laboratories), sob o protocolo: 95 ° C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, seguido por análise da curva de dissociação (curva de fusão) para verificar a amplificação de um único produto. As temperaturas para os ciclos desnaturação-hibridização-síntese utilizadas foram de acordo com a literatura, que resultou na síntese de centenas de milhões de cópias do fragmento de DNA amplificado (PFAFFL, 2004). O equipamento apresenta um termociclador e sistema ótico para a excitação da fluorescência, além de softwares para analisar as informações resultantes. A fluorescência emitida representa a quantidade do produto amplificado e aumentado de acordo com o resultado da reação (PFAFFL, 2004).

O limiar da fase exponencial é detectado durante os ciclos de temperatura e é denominado de Cycle Threshold (Ct), ou ciclo de quantificação, a partir do qual se quantifica exatamente os produtos da reação de amplificação devido à emissão de fluorescência (Sybr Green e o Taqman são os fluoróforos mais utilizados) (Rebouças *et al.*, 2013). O uso dessas sondas marcadas com corantes fluorescentes aumenta a sensibilidade do sistema e origina uma relação linear entre o número de cópias e valores de Ct, por consequência, a luz emitida no equipamento é proporcional à quantidade de alvos iniciais para reação de amplificações (REBOUÇAS *et al.*, 2013).

Todas as amostras foram executadas em triplicadas. A identificação do GenBank e as sequências de primers para todos os genes estudados são demonstradas na Tabela 2. Os dados de expressão obtidos a partir de seis repetições biológicas independentes foram usados para calcular o valor do ciclo limite (Ct). A eficiência da PCR e a taxa de expressão relativa de genes alvo em grupos experimentais versus grupos de controle foram calculadas de acordo com o método de (PFAFFL, 2004). O método comparativo de CT ($2^{-\Delta\Delta}$ método de CT) foi usado para analisar o nível de expressão desses genes em relação ao EF-1 α .

Tabela 3 - Sequência de primers específicos das citocinas, fatores de transcrição e marcadores celulares usados para amplificação dos RNAs transcritos extraídos de rim cranial e baço das tilápias do experimento.

Genes	Sequência Fw/Rv (5'-3')	Referência	
EF-1α	F: TGATCTACAAGTGCGGAGGAA R: GGAGCCCTTTCCCATCTCA	Ding-Liang Lu <i>et al.</i> 2019	40 ciclos: desnaturação doDNA: 95 °C por 15s/Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s
TNF-α	F: GCTGGAGGCCAATAAAATCA. R: CCTTCGTCAGTCTCCAGCTC	Reda <i>et al.</i> 2016	40 ciclos: desnaturação doDNA: 95 °C por 15s/Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s
IgM	F:AGGAGACAGGACTGGAATGCACAA R:GGAGGCAGTATAGGTATCATCCTC	Abo-Al-Ela <i>et al.</i> 2017	40 ciclos: desnaturação doDNA: 95 °C por 15s/Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s
IL-6	F: ACAGAGGAGGCGGAGATG R: GCAGATGCTTCGGATAGAG	Jing wang <i>et al.</i> ,2019	40 ciclos: desnaturação do DNA: 95 °C por 15s /Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s
HSP70	F:GTGACGCGAAGATGGACAAGTC R:CACCGTAAGCTACAGCCTCGTC	Saad <i>et al.</i> , 2016	40 ciclos: desnaturação doDNA: 95 °C por 15s/Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s
IL-1β	F: ATTGTCGTCCTGTCTCTATC R: AATGTCATCATGGTATTGC	Jing Wang <i>et at.</i> , 2019	40 ciclos: desnaturação do DNA: 95 °C por 15s /Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s
IL-10	F: ACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG R: CGTGCTGTTTGATGTCTGG	Ignacio <i>et al.</i> , 2005	40 ciclos: desnaturação do DNA: 95 °C por 15s /Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s
C3	F: GGTGTGGATGCACCTGAGAA R: GGGAAATCGGTACTTGCCCT	Jing wang <i>et al.</i> ,2019	40 ciclos: desnaturação do DNA: 95 °C por 15s /Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s
Lys	F: AAGGGAAGCAGCAGCAGTTGTG R: CGTCCATGCCGTTAGCCTTGAG	Jing wang <i>et al.</i> ,2019	40 ciclos: desnaturação do DNA: 95 °C por 15s /Anelamento a 60°C por 15s/ Extensão a 72°C por 15s

Fonte: Elaborado pela autora

4.5 Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 11 tratamentos (dieta controle 15d; dieta suplementada com β -glucano 15d/ dieta controle 45 d; dieta controle 45 d + vacinação; dieta β -glucano 30d; β -glucano 30d + vacinação/ controle 60d; dieta controle 60d + desafio; dieta controle 60d + vacinação + desafio; β -glucano 30d + dieta controle 30d + desafio; β -glucano 30d + dieta controle 30d + vacinação + desafio). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.0.

5 RESULTADOS

5.1.Determinação Molecular Da Expressão De Genes Por qPCR-RT

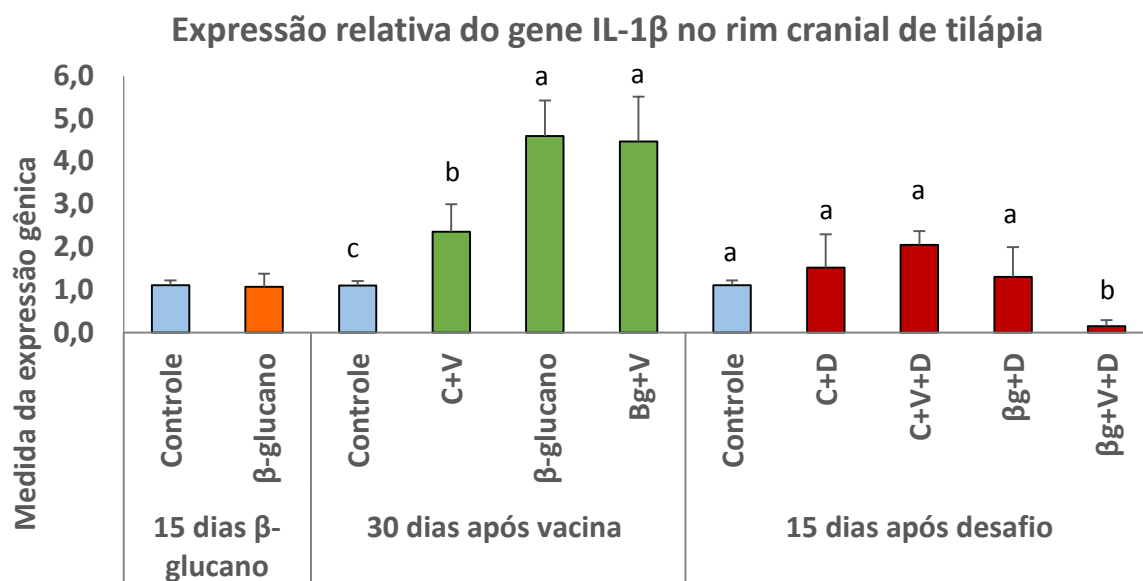
a) Expressão do gene IL- 1 β

A expressão do gene IL-1 β no rim cranial (Figura 6a), aos 15 dias de alimentação não apresentou diferenças entre os tratamentos. Após 30 dias da vacinação a expressão da IL-1 β foi maior nos peixes alimentados com β -glucano, independente da vacina, comparados com peixes alimentados com dieta controle e os controle vacinados. Aos 15 dias após desafio, a dieta com β -glucano + vacinação apresentou a menor expressão quando comparado os demais tratamentos depois do desafio.

No baço (Figura 6b), aos 15 dias de experimento, a expressão do gene IL-1 β aumentou no grupo tratado com β -glucano. Aos 30 dias após a vacinação, os grupos controle vacinado e grupo β -glucano apresentaram maior expressão do gene em relação aos demais tratamentos. Após 15 dias desafio, não houve diferença significativa entre os tratamentos com exceção do grupo que recebeu dieta com β -glucano, vacinação e desafio, que apresentou menor expressão do gene em relação aos demais tratamentos.

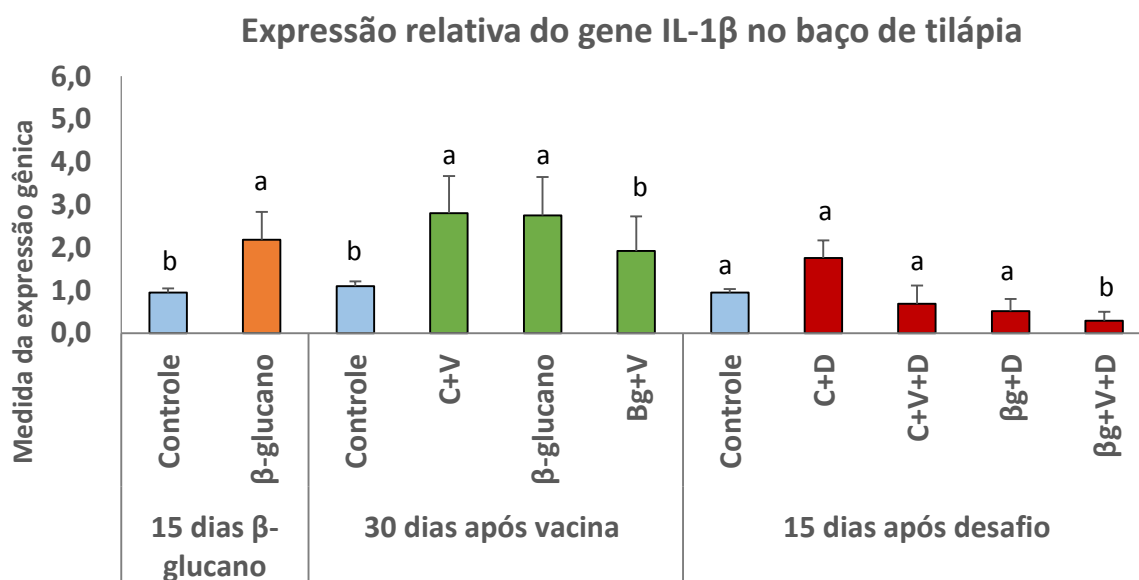
Figuras 6 a e b - Expressão relativa do gene interleucina 1 (IL-1 β) valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata em rim cranial e no baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por qPCR-RT. Letras distintas indicam diferença significativa com o controle de cada grupo ($P < 0.05$). Bg= β -glucano, C= dieta controle, V= Vacinado, D= Desafiado

6a)



Fonte: Elaborado pela autora

6b)



Fonte: Elaborado pela autora

b) Expressão do gene **TNF- α** :

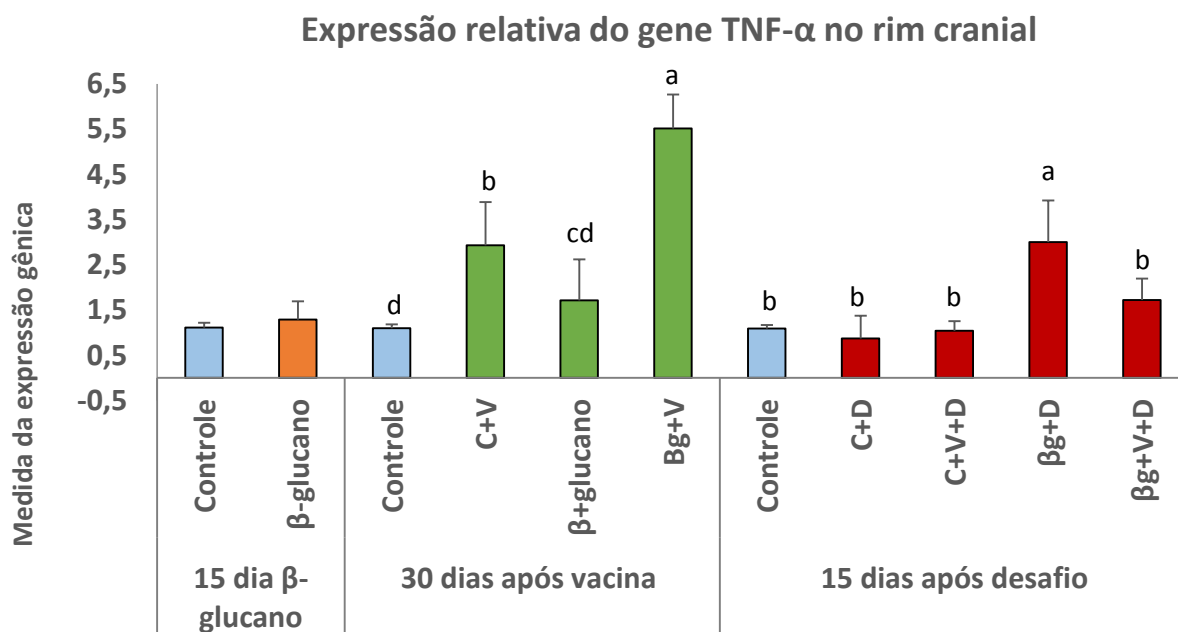
A expressão do gene TNF- α no rim cranial (Figura 7a), aos 15 dias de alimentação não apresentou diferenças entre os tratamentos. Após 30 dias da vacinação, a maior expressão do TNF- α foi nos peixes alimentados com a dieta com

β -glucano e vacinados. Aos 15 dias após desafio, a maior expressão do TNF- α ocorreu nos peixes do alimentados com β -glucano desafiado.

A expressão do gene TNF- α no baço (Figura 7b), aos 15 dias de alimentação não apresentou diferenças significativa entre os tratamentos. Após 30 dias da vacinação, os peixes não suplementados vacinado e suplementados com β -glucano apresentaram diminuição da expressão em comparação com seu controle. Aos 15 dias após desafio, os peixes da dieta controle e o grupo com β -glucano vacinados foram os que apresentaram maior expressão do TNF- α .

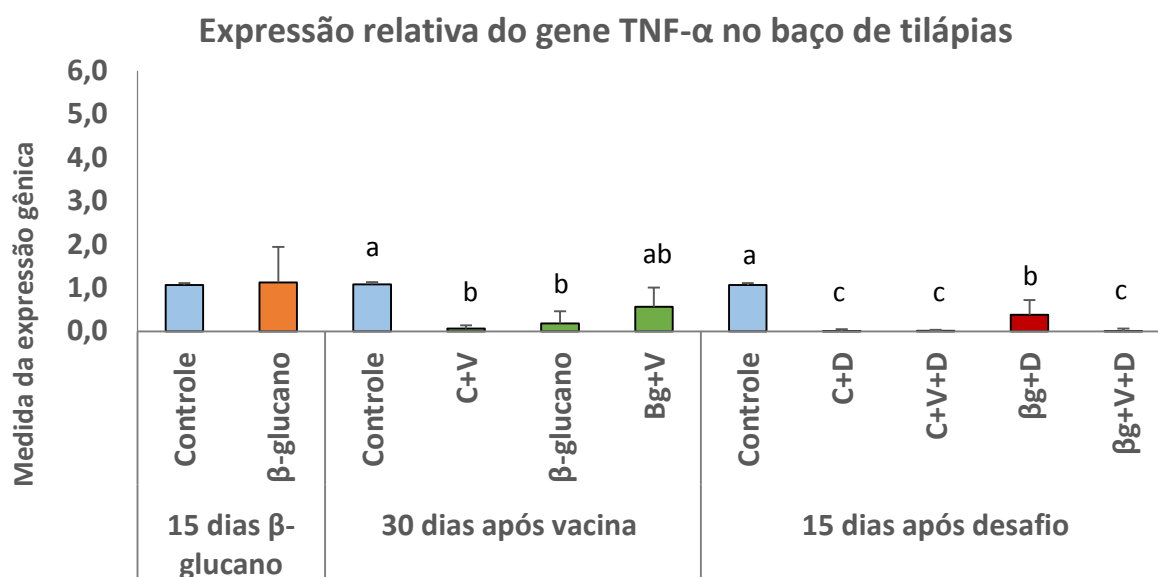
Figuras 7 a e b - Expressão relativa do gene do fator de necrose tumoral alfa TNF- α valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata no rim cranial e no baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por qPCR-RT. Letras distintas indicam diferença significativa entre tratamentos de cada grupo ($P < 0.05$). Bg= β -glucano, C= dieta controle, V= Vacinado, D= Desafiado.

7a)



Fonte: Elaborado pela autora

8b)



Fonte: Elaborado pela autora

c) Expressão do gene IL-6

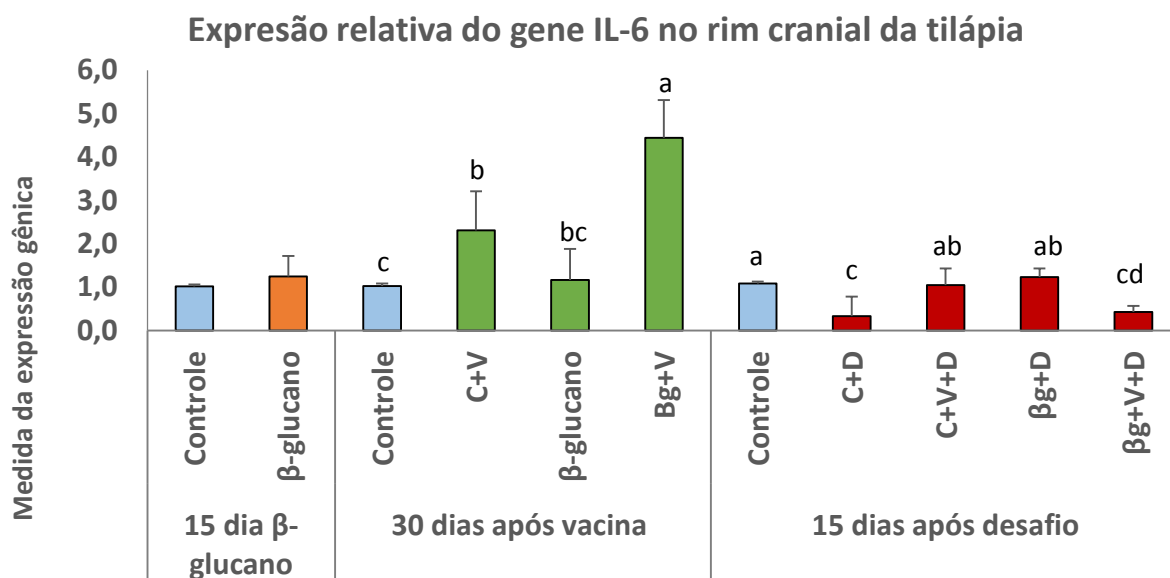
No rim cranial (Figura 9a), a expressão do gene IL-6 aos 15 dias de alimentação não apresentou diferença entre os tratamentos. Após 30 dias de alimentação da vacinação, houve aumento na expressão da IL-6 nas tilápias vacinadas e suplementadas com β -glucano comparado com controle não vacinados e os suplementados com β -glucano. Aos 15 dias após desafio, a expressão da IL-6 diminuiu nos peixes controle e desafiados, e alimentados com β -glucano, vacinado e desafiado em comparação com controle.

Já no baço (Figura 9b), aos 15 dias de alimentação, a expressão do gene IL-6 aumentou nos peixes alimentados com β -glucano. Após 30 dias da vacinação, a maior expressão da IL-6 ocorreu no grupo suplementado com β -glucano vacinado, em comparação com controle vacinado. Aos 15 dias pós desafio, houve diminuição dos níveis em todos os grupos em comparação ao controle.

Figuras 9 a e b - Expressão relativa do gene interleucina 6 (IL-6). Valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata em rim cranial e no baço de tilápia alimentadas com β -

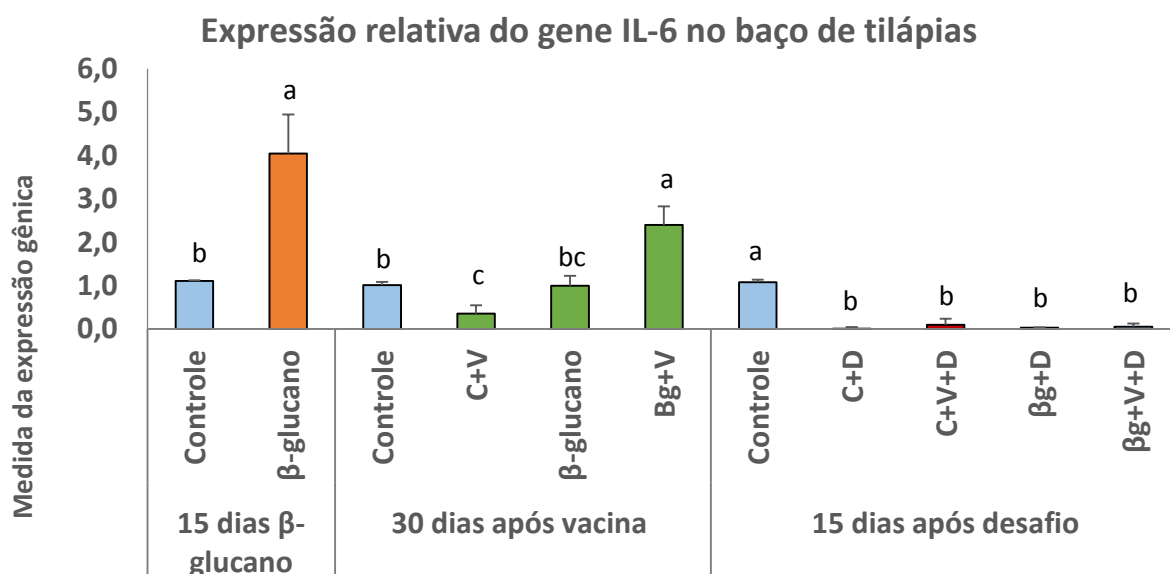
glucano, por qPCR-RT. Letras distintas indicam diferença com o controle de cada grupo ($P < 0.05$). Bg= β -glucano, C= dieta controle, V= Vacinado, D= Desafiado

9a)



Fonte: Elaborado pela autora

9b)



Fonte: Elaborado pela autora

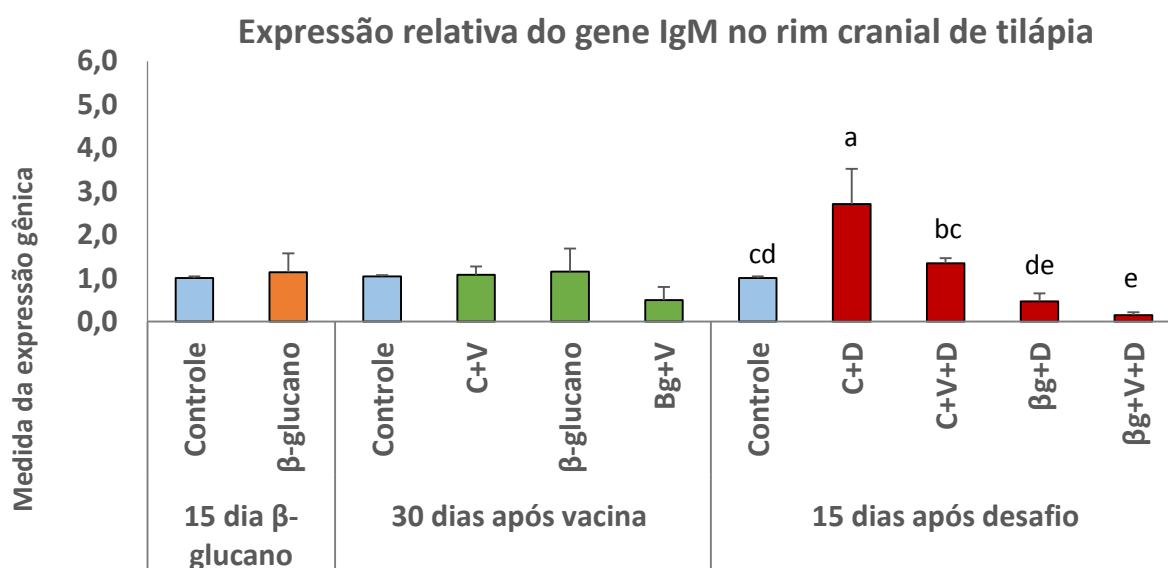
d) Expressão do gene **IgM**

A expressão do gene IgM no rim (Figura 10a), aos 15 dias de alimentação, não apresentou diferenças entre os tratamentos controle e com suplementação com β -glucano. Aos 30 dias de alimentação não houve diferença significativa entre os tratamentos. Após 15 dias do desafio o grupo não suplementado desafiado apresentou a maior expressão de IgM em comparação com demais tratamentos, já os peixes suplementados com β -glucano desafiado e suplementados com β -glucano, vacinado e desafiado apresentaram diminuição da expressão do gene IgM em comparação com o controle.

No baço (Figura 10b), aos 15 dias de alimentação, a expressão do gene IgM aumentou nos peixes suplementados com β -glucano. Após 30 dias da vacinação, os grupos controle e β -glucano que foram vacinados apresentam maior expressão do gene IgM em comparação com o grupo controle não suplementado. Aos 15 dias pós desafio não houve diferença significativa entre os tratamentos.

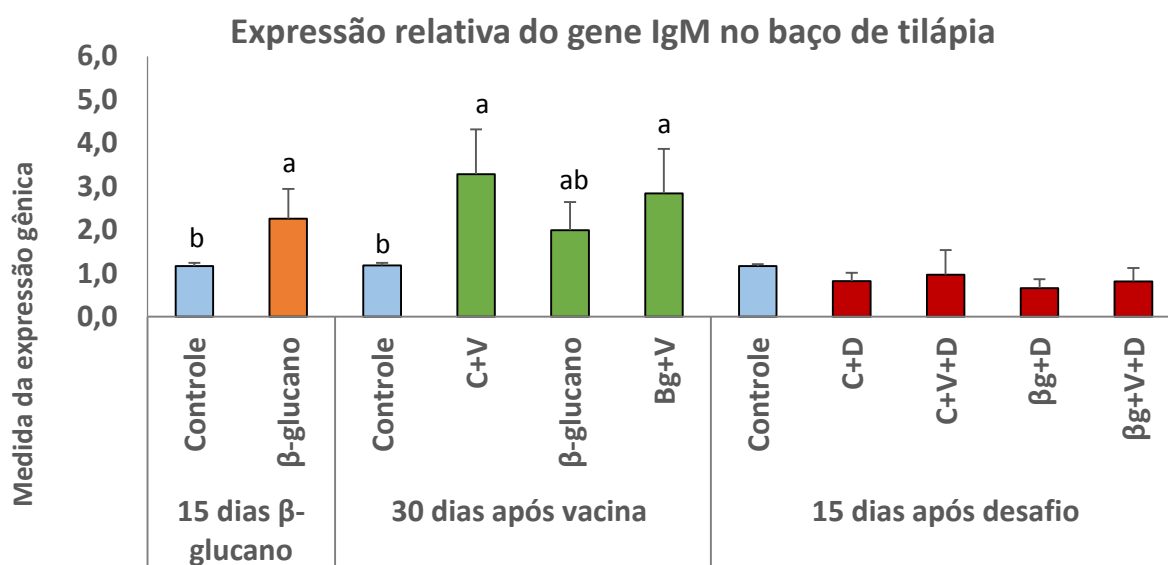
Figuras 10 a e b - Expressão relativa do gene **IgM** valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata no rim cranial e no baço de tilápia suplementado com β -glucano, por qPCR-RT. Letras distintas indicam diferença com o controle de cada grupo ($P < 0.05$). Bg= β -glucano, C= dieta controle, V= Vacinado, D= Desafiado

10a)



Fonte: Elaborado pela autora

10b)



Fonte: Elaborado pela autora

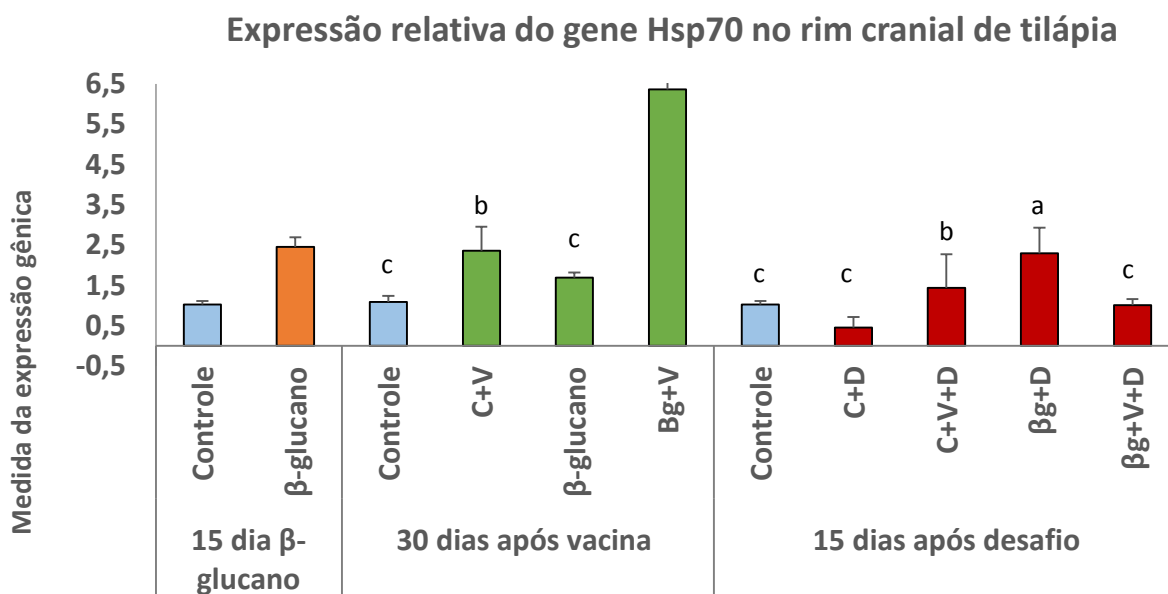
e) Expressão do gene **Hsp70**

A expressão do gene Hsp70 no rim cranial (Figura 11a), aos 15 dias de alimentação, foi maior nos peixes alimentados com β -glucano. Após 30 dias da vacinação, as tilápias suplementadas com β -glucano vacinadas apresentaram maior expressão da Hsp70 entre os tratamentos, já os peixes do grupo controle não suplementado vacinados apresentaram maior expressão de Hsp70 que os peixes não suplementado e suplementado com β -glucano. Após 15 dias do desafio, o grupo que apresentou maior expressão desse gene ocorreu nos peixes suplementados com β -glucano, seguido do grupo controle não suplementado, associado com vacinação e desafio, em comparação com demais tratamentos.

Aos 15 dias de alimentação, no baço (Figura 11b), não houve diferenças significativas na expressão do gene Hsp70 entre os tratamentos. Após 30 dias da vacinação, os grupos apenas suplementados com β -glucano e suplementados com β -glucano vacinado apresentaram diminuição da expressão do gene. Aos 15 dias pós desafio os grupos com tratamento controle não suplementado e suplementado β -glucano vacinado e desafiado apresentou maior expressão do gene em comparação com demais tratamentos.

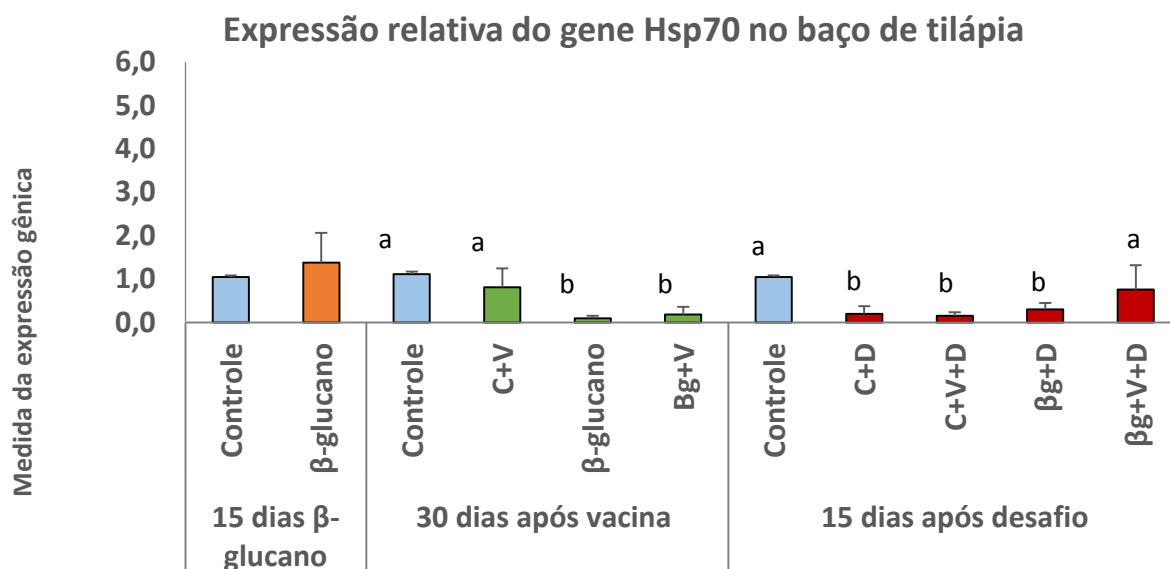
Figuras 11a e 11b. Expressão relativa do gene das proteínas de choque térmico de 70 kDa (**Hsp70**) valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata. No rim cranial e no baço de tilápia alimentadas com β -glucano, por qPCR-RT. Letras distintas indicam diferença com o controle de cada grupo ($P < 0.05$). Bg= β -glucano, C= dieta controle, V= Vacinado, D= Desafiado

11a)



Fonte: Elaborado pela autora

11b)



Fonte: Elaborado pela autora

d) Expressão do gene **IL- 10**

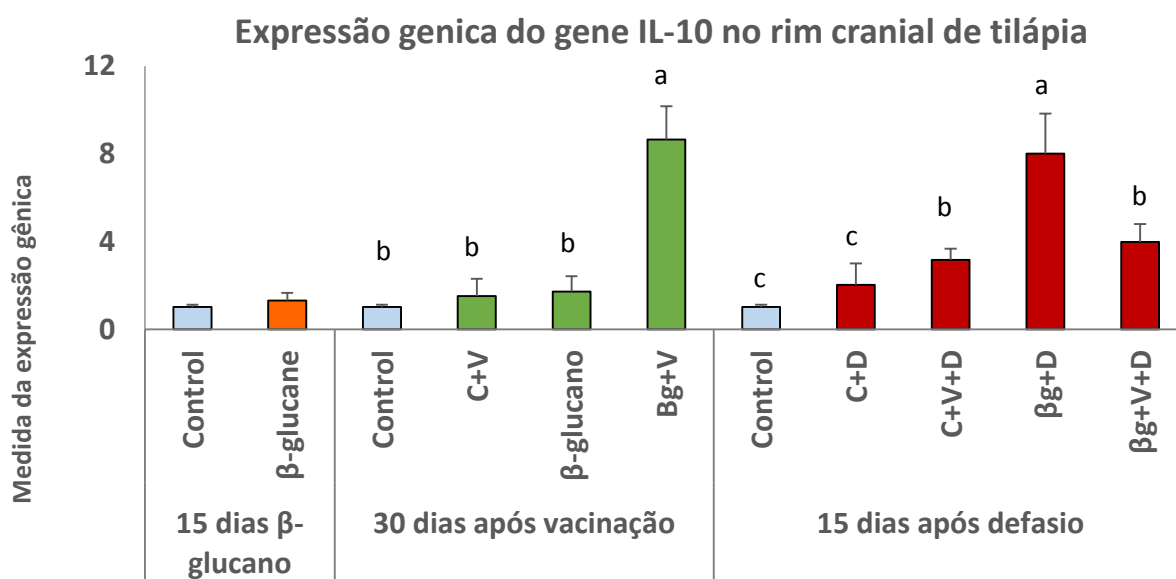
Aos 15 dias de alimentação, no rim cranial (Figura 12a), não houve diferenças significativas na expressão do gene IL-10 entre os tratamentos. Após 30 dias da vacinação, os peixes suplementados com o β -glucano vacinado apresentaram aumento significativo da expressão do gene. Aos 15 dias após desafio, os peixes que foram suplementos com β -glucano e desafiados apresentaram maior expressão do gene em comparação com demais tratamentos, bem como os peixes vacinados e desafiados (independente da suplementação do β -glucano) apresentaram maior expressão em comparação com o grupo controle não suplementado e o controle não suplementado desafiado.

Aos 15 dias de alimentação, no baço (Figura 12b), não houve diferenças significativas na expressão do gene IL-10 entre os tratamentos. Após 30 dias da vacinação, as tilápias que foram suplementado com β -glucano e receberam a associação de β -glucano e vacinação apresentaram diminuição da expressão do gene em comparação com os demais tratamentos. Aos 15 dias pós desafio, a

associação vacinação e desafio, β -glucano e desafio e β -glucano, vacinação e desafio promoveram diminuição da expressão do gene IL- em comparação com demais tratamentos.

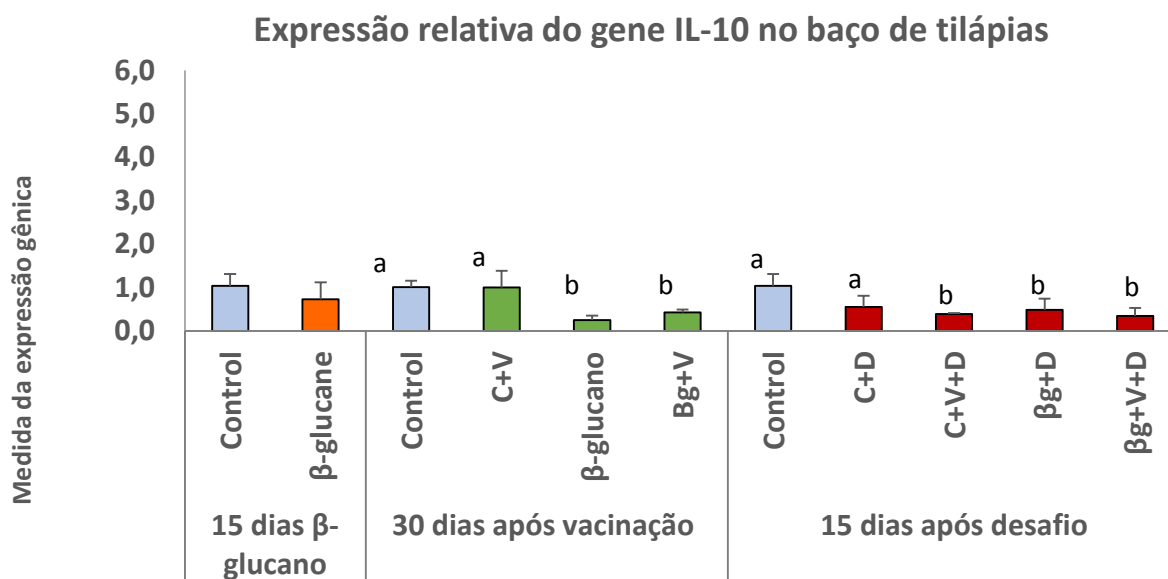
Figuras 12 a e b - Expressão relativa do gene da **IL-10** valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata no rim cranial e no baço de tilápias alimentadas com β -glucano, por qPCR-RT. Letras distintas indicam diferença significativa com o controle de cada grupo ($P < 0.05$). Bg= β -glucano, C= dieta controle, V= Vacinado, D= Desafiado

12a)



Fonte: Elaborado pela autora

12b)



Fonte: Elaborado pela autora

e) Expressão do gene **C3**

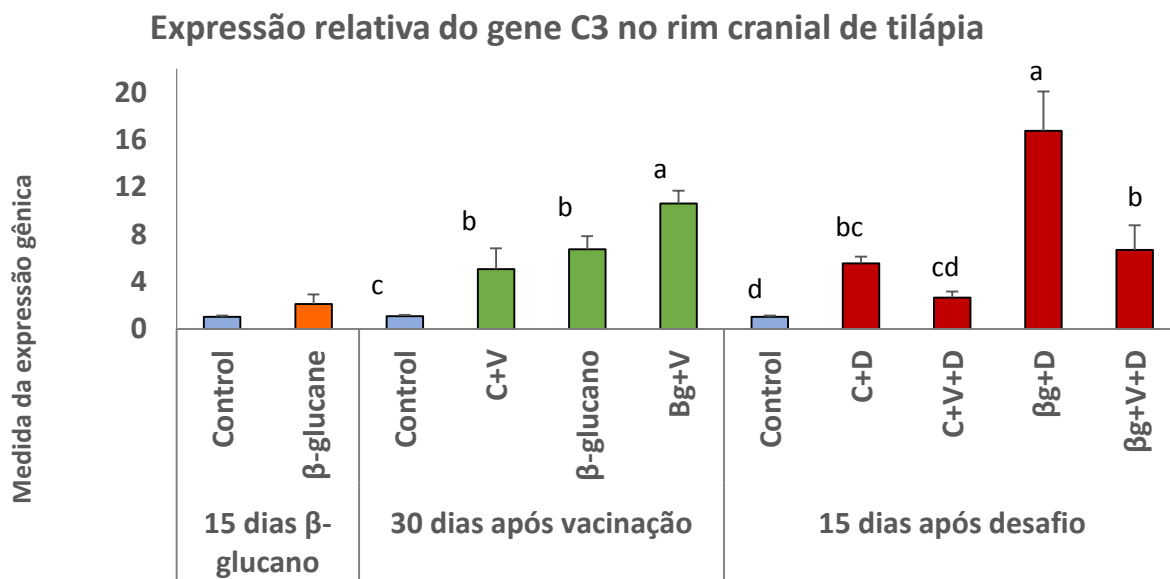
A expressão do gene C3 no rim cranial (Figura 13a), aos 15 dias de alimentação, não apresentou diferença entre os tratamentos. Após 30 dias da vacinação, as tilápias suplementadas com β-glucano e vacinadas apresentaram uma maior expressão significativa da C3 entre os tratamentos, seguida dos tratamentos controle vacinado, e alimentado com β-glucano. Após 15 dias do desafio, o grupo de peixes suplementados com β-glucano e desafiados apresentaram a maior expressão desse gene, seguido do grupo de peixes alimentados com β-glucano, vacinado e desafiado, em comparação com os tratamentos controle e controle vacinado e desafiado.

Aos 15 dias de alimentação, no baço (Figura 13b), não houve diferenças significativas na expressão do gene C3 entre os tratamentos. Após 30 dias da vacinação, a expressão desse gene aumentou nos peixes que foram vacinados, entretanto diminuiu nos peixes alimentados com β-glucano, e na associação β-glucano e vacinação, em comparação ao controle. Aos 15 dias pós desafio, houve uma imunossupressão em todos os tratamentos administrados.

Figuras 13 a e b - Expressão relativa do gene da **C3** valores são médias ± desvio padrão em duplicata no rim cranial e no baço de tilápia alimentadas com β-glucano,

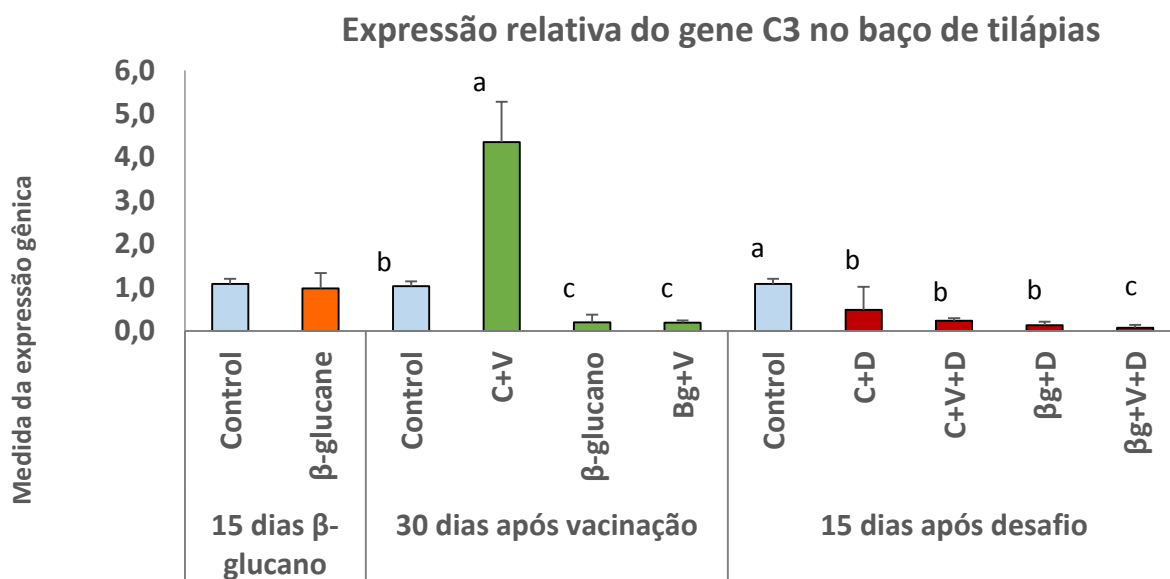
por qPCR-RT. Letras distintas indicam diferença com o controle de cada grupo ($P < 0.05$). Bg= β -glucano, C= dieta controle, V= Vacinado, D= Desafiado

13a)



Fonte: Elaborado pela autora

13b)



Fonte: Elaborado pela autora

e) Expressão do gene **Lys**

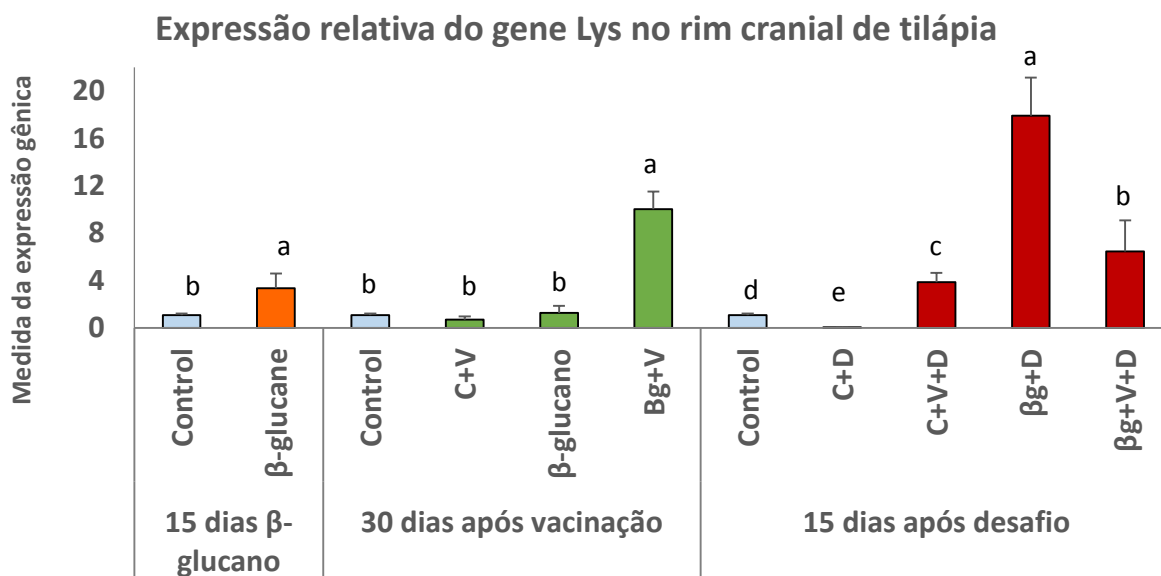
No rim cranial (Figura 14a), a expressão do gene Lys aos 15 dias de alimentação foi maior para nos peixes alimentados com β -glucano. Após 30 dias da vacinação, houve um aumento significativo na expressão da Lys nas tilápias suplementadas com β -glucano evacinadas em comparação com os demais grupos. Aos 15 dias após desafio, a expressão da Lys aumentou nos peixes controle não suplementados vacinados e desafiados, no grupo alimentados com β -glucano e vacinado; e nos peixes alimentados com β -glucano e vacinado e desafiados, entretando diminuiu no grupo controle desafiado.

Já no baço (Figura 14b), aos 15 dias de alimentação, não houve diferença significativa na expressão do gene Lys. Após 30 dias da vacinação, as tilápias que foram suplementados com β -glucano (não vacinadas e vacinadas) tiveram uma diminuição na expressão do gene em comparação com os demais tratamentos. Aos 15 dias pós desafio, os peixes vacinados, desafiado e alimentados (dieta controle e com β -glucano) apresentaram diminuição dos níveis de expressão em comparação aos demais tratamentos.

Figuras 14 a e b - Expressão relativa do gene da **Lys** valores são médias $\pm$ desvio padrão em duplicata no rim cranial e no baço de tilápia alimentadas com β -glucano,

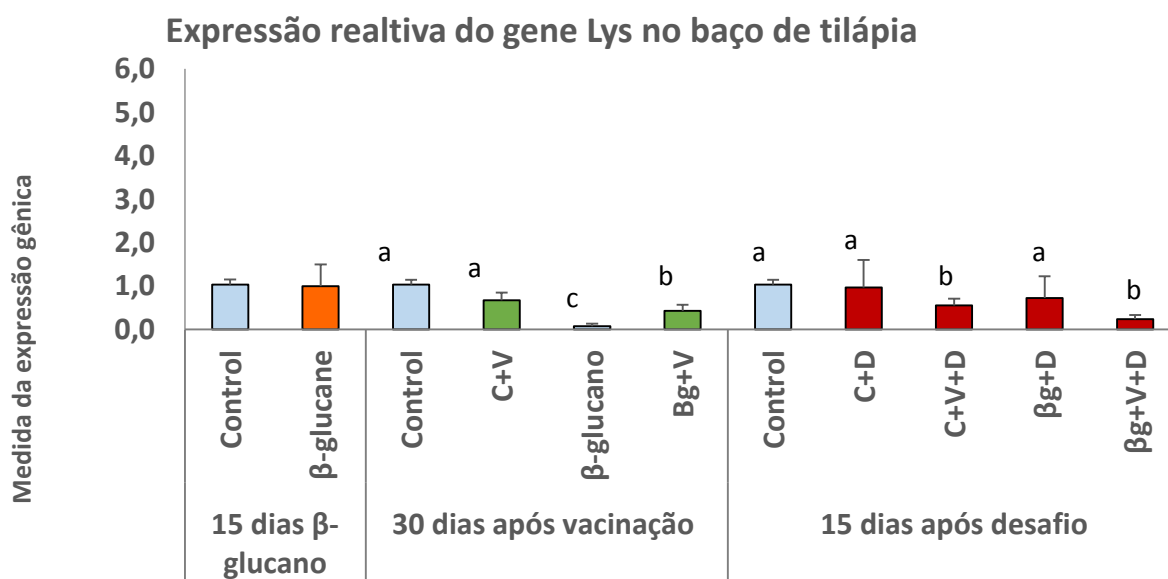
por qPCR-RT. Letras distintas indicam diferença com o controle de cada grupo ($P < 0.05$). Bg= β -glucano, C= dieta controle, V= Vacinado, D= Desafiado

14a)



Fonte: Elaborado pela autora

14b)



Fonte: Elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

Devido a seu alto valor comercial, bom desempenho zootécnico, alta taxa de reprodução, e ampla capacidade de se adaptar em diversas condições, a tilápia vem sendo cultivada no mundo. Porém o sistema de produção intensivo pode levar ao aparecimento de diversas doenças que ameaçam o cultivo da espécie. Uma das enfermidades mais comuns é a infecção por estreptococoses, que resulta em altas taxas de mortalidade e grandes perdas econômicas (XIAO-LI *et al.*, 2019). Diversas vacinas para peixes foram desenvolvidas e tiveram boa eficácia contra patógenos. A aplicação das vacinas deve promover diminuição da infecção patogênica e a administração de antibióticos, pois o uso contínuo de antibiótico leva a resistência em vários patógenos (AMPHAN *et al.*, 2019).

Atualmente diversos produtos imunoestimulantes estão sendo comercializados, dentre eles o β -glucano que é utilizado para aumentar a produtividade e a imunidade de peixes. Isso se deve as propriedades que o β -glucano possui de colaborar com o aumento da defesa, por estimular componentes presentes no sistema imunológico inato e adquirido (WHITTINGTON *et al.*, 2005).

Após 15 dias de alimentação, os resultados para o rim cranial mostraram aumento significativo da expressão do gene Hsp70 e da Lys nos peixes que foram alimentados com β -glucano, mostrando que houve influência da suplementação na dieta com β -glucano. Entretanto a expressão dos genes IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IgM, IL-10, C3 não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

O aumento da expressão Hsp70 e da Lys indicam adaptação do organismo à presença do imunomodulador, que é um PAMP (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2014). Dawood *et al.* (2020) também mostraram resultados positivos do gene Hsp70 em tilápias alimentadas com β -glucano e expostas a componentes tóxicos mostrando melhor resultado após em tilápias alimentadas com β -glucano.

Já no baço, 15 dias após alimentação com a dieta β -glucano os peixes apresentaram aumento das expressões dos genes IL-1 β , IL-6 e IgM. Porém, não houve diferença na expressão do TNF- α e Hsp70, IL-10, C3 e Lys entre os tratamentos. Os peptidoglicanos e lipopolissacarídeos podem aumentar

significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas pró-inflamatórias possuem respostas úteis contra condições de estresse ambiental (DAWOOD *et al.*, 2020). A IL-1 β tem uma função importante na imunidade contra patógenos e tecidos lesionados, além de modular as respostas imunes ao estimular ou liberar outras citocinas de outras células, como linfócitos ativados (MEHRABI *et al.*, 2020).

A IL-6 tem ação importante na homeostase de células e tecidos, ativando genes-alvo envolvidos no crescimento, diferenciação, apoptose e proliferação celular (MEHRABI *et al.*, 2020). Outros estudos também observaram que o uso de β -glucano aumenta a expressão do gene IL-6 (LOVOLL *et al.*, 2007).

A IgM é o principal anticorpo sistêmico, apresenta-se como tetrâmeros, e normalmente peixes teleósteos apresentam expressão de IgM elevada no rim, que é o principal órgão hematopoiético, e também no baço, que é o principal órgão secundário linfóide (ZHANG *et al.*, 2017; HIRONO *et al.*, 2003), entretanto no presente estudo, aos 15 dias de alimentação com β -glucano, a expressão do gene aumentou apenas no baço. A concentração de IgM pode variar de acordo com idade, tamanho, sexo, estação, ambiente e vacinação e infecção (HORDVIK, 2015).

Aos 30 dias após a vacinação, os peixes alimentados com β -glucano e vacinados apresentaram aumento da expressão dos genes IL-1 β , TNF- α , IL-6 e Hsp70, IL-10, C3 e Lys na avaliação da expressão gênica no rim cranial.

A IL-1 β , IL-6 e TNF- α e IL-10 são citocinas produzidas principalmente pelos macrófagos ativos. Elas são citocinas pró-inflamatórias que desempenham papel importante no início do processo inflamatório devido ao estímulo para recrutamento e ativação de macrófagos; auxiliando na resposta adaptativa e regulação imunológica (BIRD *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

No presente estudo o gene da IL-1 β aumentou com todos os estímulos provocados nessa etapa, sendo maior após alimentação com β -glucano e em associação com a vacinação. Assim como nos resultados encontrados nesse estudo, Abdelhamid (2020) também registrou que a expressão do gene IL-1 β aumentou significativamente no rim cranial. Já os genes TNF- α e IL-6 aumentaram com os estímulos da vacinação e mais expressivamente com associação β -glucano e vacinação. O TNF- α atua para eliminar patógenos por meio da indução de várias respostas celulares, e é conhecido como biomarcador e indicador de saúde de mamíferos e peixes (MEHRABI *et al.*, 2020), e os resultados indicaram que a

vacinação associada ao imunoestimulante melhoram a defesa contra patógenos. A IL-10 é uma citocina multifuncional, e atua na regulação do crescimento celular, promove a proliferação celular e participa de respostas inflamatórias e imunológicas (SABAT *et al.*, 2010). O mesmo perfil de resposta foi observado para a expressão do gene Hsp70, evidenciando a adaptação do organismo frente aos manejos de imunomodulação e vacinação impostos. Entretanto, a expressão do gene IgM não se modificou, mesmo após vacinação, apesar de esperado a presença de IgM pode variar de acordo com idade, tamanho, sexo, estação, ambiente e vacinação e infecção, além do tempo em que são realizadas as análises dos tecidos (HORDVIK, 2015; ZHANG *et al.*, 2017).

No presente estudo, a associação de β -glucano e vacinação promoveu aumento na expressão de genes no rim cranial, das citocinas pró-inflamatórias importantes para a defesa orgânica. O mesmo perfil foi observado por WEI *et al.* (2021), com aumento da expressão de genes das mesmas citocinas, no baço. Esses resultados indicam que o β -glucano é um potencial adjuvante para a vacina contra *S. agalactiae*.

A 30 dias após a vacinação, aos 45 dias de experimento, demonstrou que peixes vacinados e alimentados com β -glucano apresentaram aumento da expressão do gene IL-1 β . Em caso de inflamação, como ocorre no processo de vacinação, há liberação de citocinas como TNF- α seguidas pelas IL-1 β e IL-6 e depois de quimiocinas para atrair a migração de células fagocíticas para o local de inflamação (XIAO-LI *et al.*, 2019). O gene da IL-6 aumentou com a associação de β -glucano e vacinação, e o gene da IgM aumentou com a associação de β -glucano e vacinação, indicando que o uso de adjuvantes, como o β -glucano, pode aumentar o efeito imunológico da vacina e promover a imunidade inata, e não específica, bem como imunidade celular, humoral e imunidade de mucosa (NGUYEN *et al.*, 2017a; NGUYEN *et al.*, 2017b; FANGNING *et al.*, 2019; MEENA *et al.*, 2013).

Na terceira coleta, aos 15 dias pós desafio, 60 dias de experimento, os peixes alimentados com β -glucano e desafiados apresentaram aumento da expressão do gene TNF- α e Hsp70, IL-10, C3 e Lys, na avaliação da expressão gênica no rim cranial. Indicando que a administração do imunoestimulante favorece a produção de proteínas de defesa e as proteínas de recuperação por período prolongado, uma vez que essa coleta foi realizada 30 dias após o término da alimentação com o imunoestimulante. Já a expressão do gene IgM aumentou nos peixes apenas desafiados. ABDELHAMID e ELSHOPAKEY (2020) encontrou aumento na expressão

dos genes da IL-10 e IgM em peixes que eram alimentados com β -glucano e que foram expostos a composto tóxico evidenciando a influência da ação imunoestimulante do β -glucano.

Nguyen *et al.* (2017) e Zhu *et al.* (2019) demonstraram que a expressão do gene IgM aumenta no baço após vacinação, como visto desse estudo após 15 de alimentação e 30 Dias após vacinação. E Wei *et al.* (2021) observaram aumento da expressão do gene IgM com associação da vacinação e β -glucano na garoupa híbrida (*Epinephelus fuscoguttatus* $\times$ *Epinephelus lanceolatus*), como observado neste estudo. Entretanto em peixes alimentados com β -glucano, vacinados e desafiados houve diminuição da expressão dos genes IL-1 β , IL-6 e IgM.

Já no baço, 15 dias após do desafio, 60 dias de experimento, houve diminuição da expressão dos genes estudados. Os genes IL-10 e Lys diminuíram a sua expressão nos peixes alimentados com β -glucano, nos vacinados e desafiados. Na IL-6 e C3 houve diminuição em todos os tratamentos em comparação com o controle, bem como o gene TNF- α , exceto nos peixes alimentados com β -glucano e desafiado. As ações do β -glucano não estão completamente esclarecidas, e este imunoestimulante pode apresentar estímulos anti-inflamatórios regulatórios que podem induzir a supressão da expressão de alguns genes (ABDELHAMID *et al.*, 2020)

O gene Hsp70 diminuiu em todos os tratamentos, exceto nos peixes alimentado com β -glucano, vacinados e desafiados devido à presença do imunomodulador, que é um PAMP (BILLER-TAKAHASHI *et al.*, 2014). Outro fator que evidencia os resultados seriam as alterações sofridas pelo manejo de desafio pois essa é uma prática considerada estressante (ABREU, 2007).

A dieta com β -glucano associado com vacinação e o desafio com microrganismos *S. agalactiae* inativada mostrou ter grande eficiência na expressão dos genes no rim cranial principalmente nas citocinas que na sua grande maioria, são produzidas no local de entrada de patógenos e geram sinais inflamatórios para fagócitos realizarem a destruição do patógeno invasor (XIAO-LI, 2019). De acordo com Xiao-Li, *et al.* (2019) isso ocorre pois os receptores Toll-like (TLRs), que são um grupo de receptores que atuam através do reconhecimento de patógenos (PAMPs), desencadeando respostas inflamatórias já que os “toll-like receptors” (TLRs) reconhecem lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS) e flagelina bacteriana.

Como resultado, o β -glucano se mostrou eficiente na potencialização dos efeitos da vacina contra *S. agalactiae* como reportado por (WHITTINGTON *et al.*, 2005) que mostraram que o β -glucano também teve eficiência melhorando os efeitos da vacina contra *S. iniae*.

Comparando os dois órgãos, pode-se observar que a expressão de quase todos os genes foi, apresentaram sua expressão mais alta após os 30 dias de vacinação, menos a lisozima e C3 que também teve um aumento na expressão após os 15 dias de desafio. E quase todos os genes foram expressos em maior quantidade no rim cranial que no baço, com exceção do IgM que teve sua maior expressão no baço.

A IgM é um bom marcador do estado imunológico em peixe, pois o anticorpo universal e único componente da resposta imune humoral específica no teleosteo (HAKIM *et al.*, 2019; SINYAKOV *et al.*, 2002).

De todos os genes estudados, a maioria deles foram expressos em altas quantidades tanto no rim cranial quanto no baço, induzido pelo efeito imunomodulador do β -glucano associado a vacinas principalmente entre os 15 primeiros dias de experimento e 30 dias após a vacinação.

. O efeito como adjuvante foi observado por administração oral do β -glucano, no presente estudo, embora para algumas vacinas de peixes esse efeito tenha sido melhor quando administrado por via intraperitoneal quando comparado à via oral ou por imersão, entretanto deve-se observar que essa via apresenta suas desvantagens (MEENA *et al.*, 2013; ESTEBAN *et al.*, 2000; MISRA *et al.*, 2006).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que o β -glucano pode ser uma ferramenta com o potencial adjuvante para proteção contra *S. agalactiae* podendo atuar no controle e na prevenção de enfermidades estreptocócicas, indicando que há interação benéfica entre a administração do β -glucano e a vacinação em tilápias. Foi possível verificar a ação do β -glucano sobre a expressão de genes do sistema imune de tilápias; uma vez que mostrou aumento a expressão de genes de citocinas do sistema imune, tais como: IL-1 β , TNF- α , IL-6, Hsp70, IL-10, C3 e Lys no rim cranial e da IgM no baço. Observou-se que o β -glucano promoveu proteção duradoura, induzindo a expressão de genes após 30 dias do término da administração na dieta.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHMAN, A.H. **Basic Immunology**: functions and disorders of the immune system. [S.l.: s.n.], 2004.
- ABDELHAMID, F. M.; ELSHOPAKEY, G. E.; AZIZA, A. E. Ameliorative effects of dietary *Chlorella vulgaris* and β -glucan against diazinon-induced toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Shellfish Immunology**. v. 96, p. 213-222, 2020.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; PILARSHI, F.; SEBASTIÃO, F.A.; URBINATI, E.C. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n.6,. 2013.
- ABREU, J. S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg,) com b 1,3 glicano**: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura. 2017. Tese (Doutorado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, 2017.
- ALTERTHUM, F. Nutrição e metabolismo bacterianos. *In*: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (ed.). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p 21-30.
- AMPHAN F.; 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 and Shellfish Immunology**, v. 87, p. 120-138, 2019.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ANDRADE, A. F. B.; OLIVEIRA-SILVA, M.; SILVA, S. G. C.; MOTTA, I. J. F.; BONVICINO, C. R. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 6, p. 673-676, 2006.
- AROSA F. A.; CARDOSO E. M. Mecanismos de transdução de sinais em linfócitos.. *In*: AROSA, F. A.; CARDOSO, E. M.; PACHECO, F. C. (ed.). **Fundamentos de Imunologia**. 2. ed. Lisboa: LIDEL-Edições Técnicas, 2012. p.321-342.
- AZEVEDO-SANTOS, V. M.; RIGOLIN-SÁ, O.; PELICICE, F. M.; Growing, losing or introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas Reservoir. **Sociedade Brasileira de Ictiologia**, v. 4, n. 9, p. 915-919, 2011.
- BAYNE, C. J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.725-743, 2001.
- BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. Immunity. *In*: EVANS, D.H. **The physiology of fishes**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.215-242.
- BIRD, S.; ZOU, J.; WANG, T.; MUNDAY, B.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, C.J. Evolution of interleukin-1. **Cytokine e Growth Factor Reviews**. v. 13, p. 483-502, 2002.
- BRATTGJERD, S.; EVENSEN, O. A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in the head kidney phagocytes

of experimentally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 55–65. 1996.

CAVALCANTE, R. B. **Utilização de imunoestimulantes em tilápia-do-nilo**: . 2015. 120 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) – Instituto de Pesca, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, São Paulo, 2015.

CARBALLO, C.; CASTRO, D.; BORREGO, J.J.; MANCHADO, M.; Gene expression profiles associated with lymphocystis disease virus (LCDV) in experimentally infected Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 66, p. 129-139, 2017.

CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of diferente β -glucano on the respiratory burst of tubot (*Psetta máxima*) and gilthead seabream (*Spaurus aurata*) phagocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 529-541, 2002.

Chen, H.H.LIN, H.T. FOUNG, Y.F. LIN, J.H.Y The bioactivity of teleost IL-6: IL-6 protein in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) induces Th2 cell differentiation pathway and antibody production. **Developmental & Comparative Immunology**, v.38, n. 2, p. 285-294, 2012.

MESTECKY, J.; LAMM, M.E.; OGRA, P.; STROBER, W.; BIENENSTOCK J.; MCGHEE, J.; MAYER, L. *Mucosal Immunology*. 2. ed. San Diego: **Academic Press**, 1999. p. 43-64.

CRUVIEL, W. M.; JUNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A .P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C.; Sistema imunitário: parte I: fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Levamisole is a potent enhancer of gilthead sea bream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, p. 169–174, 2002.

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

DANILOVA, N. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin. **Nature Immunology**, v.6, n.3, p.295-302, 2005.

DAVIDSON, G.A.; ELLIS, A. E.; SECOMBES, C.J. Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental and Comparative Immunology**, v.17, p.373–376, 1993.

DAWOOD, A. O. M.; ABDO, S.E.; GEWAILY, M.; MOUSTAFA, E. M.; MOUSTAFA, S. S.; EL-KADER, M. F. A.; 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 and Shellfish Immunology**, v. 98, p. 301-311, 2020.

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

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

- ESTEBAN, M. A.; CUESTA, V. M.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 10, p. 543-554, 2000.
- FAIRBROTHER, A.; SMITS, J.; GRASMAN, K. Avian immunotoxicology. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 7, n. 2, p. 105-137, 2010.
- FANGNING, X.; XU, C.; XIAO, S.; LU, M.; LIMBU, S.M.; WANG, X.; DU, Z.; QIN, J.G.; CHEN, L. Effects of α -lipoic acid on growth performance, body composition, antioxidant profile and lipid metabolism of the GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed high-fat diets. **Aquaculture nutrition**, v. 25, p. 585-596, 2019.
- FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 473-487, 2004.
- FIGUEIRAS, A.; DOMENECH-MASSONS, J. M.; Cadarso C. Regression models: calculating the confidence interval of effects in the presence of interactions. **Statistics in Medicine**, v. 17, p. 2099-2105, 1998.
- FIGUEIREDO H. C. P. Streptococcus agalactiae associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, 2006.
- GALLANI, S. U. **Infecção experimental de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por *Aeromonas hydrophila*: avaliação de antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro**. 157 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2019.
- GALINDO-VILLEGAS, J; HOSOKAWA, H. **Immunostimulants**: towards temporary prevention of diseases in marine fish. México: Researchgate, 2004. p. 273-319.
- GARCIA, F. **Suplementação alimentar com 'beta'-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. 2008. xi, 100 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2008.
- GATLIN, C. L.; PIEPER, R.; HUANG, S. T.; MONGODIN, E.; GEBREGEORGIS, E.; PARMAR, P. P.; CLARK, D. J.; ALAMI, H.; PAPAIZISI, L.; FLEISCHMANN R. D.; GILL, S. R.; PETERSON, S. N. Proteomic profiling of cell envelope-associated proteins from *Staphylococcus aureus*. **Wiley Online Library: Proteomics and Systems Biology**, v. 6, n. 5, p. 1530-1549. 2006.
- GOLDSBY, R. E.; HAYS, L. E.; CHEN, X.; OLMSTED, E. A.; SLAYTON, W. B.; SPANGRUDE, G. J.; PRESTON, B. D. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase δ proofreading. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p.15560-15565, 2002.
- GOODRIDGE H. S.; REYES, C. N.; BECKER, C. A.; KATSUMOTO, T. R.; MA, J.; WOLF, A. J.; BOSE, N.; CHAN, A. S. H.; MAGEE, A. S.; DANIELSON, M. E.; WEISS, A.; VASILAKOS, J. P.; UNDERHILL, D. M. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a “phagocytic synapse”. **Nature**, v. 472, p. 471–475, 2011.
- GUARDIOLA, F.A.; CUARTERO, M.; COLLADO-GONZÁLEZ, M.D.M.; BAÑÓES, F.G.D.; CUESTA, A.; MORIÑIGO, M.A.; ESTEBAN, M. A. Terminal carbohydrates abundance, immune related enzymes, bactericidal activity and physico-chemical parameters of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) skin mucus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 60, p. 483-491, 2017.

- HALWART, M.; SOTO, D.; ARTHUR, J.R. (ed.). **Cage aquaculture**: regional reviews and global overview. Roma: FAO, 2007. 241p. (Fisheries Technical Paper, 498).
- HAKYA, S. R.; LABH, S. N. Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. **Biotechnology and Bioscience**, v.2, 2014.
- HANSAN, M. Tilápia conquista aquicultores e consumidores do mundo todo. São Paulo Revista. Canal Rural. 2018.
- HANSEN, J. D.; LANDIS, E. D.; PHILLIPS, R. B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **Proceedings of the National Academic of Science of the Unites States of America**, v. 102, n. 19, p. 6919–6924, 2005.
- HARIKRISHNANA R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquiculture**, v. 317, p. 1-15, 2011.
- HIRONO, I.; NAM, B.H.; ENOMOTO, J.; UCHINO, K.; AOKI, T. Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. **Fish Shellfish Immunology**, v. 15, p.63–70, 2003.
- HOLLAND, M.C.H; LAMBRIS, J.D. The complement system in teleosts. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, n. 2, p. 399–420, 2002.
- HONG, FENG, H.; ZHOU, Z.; GHIRLANDO, R.; BAI, Y. Identification of Functionally Conserved Regions in the Structure of the Chaperone/CenH3/H4 Complex. **Journal of Molecular Biology**, 2013.
- HORDVIK, I. Identification of a novel immunoglobulin d transcript and comparative analysis of the genes encoding IgD in Atlantic salmon and Atlantic halibut. **Molecular and Immunology**, v. 39, p. 80-85, 2002.
- HORDVIK, I. Immunoglobulin Isotypes in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. **Biomolecules**, v. 5, p. 166-177, 2015.
- HOSOKAWA, N.; HARA, T.; KAIZUKA, T.; KISHI, C.; TAKAMURA, A.; MIURA, Y.; IMERA, S.I.; NATSUME, T.; TAKEHANA, K.; YAMADA, N.; GUAN, J.L.; OSHIRO, N.; MIZUSHIMA, N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1– Atg13– FIP200 complex required for autophagy. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 7, p. 1981-1991, 2009.
- ISPIR, U.; DORUCU, M. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 29, p. 1169–1176, 2005.
- JAEHRIG, S. C.; ROHN, S.; KROH, L.; WILDENAUER, F.; Antioxidative activity of (1-3), (1-6)-b-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. **LWT. Food Science and Technology**, v. 41, p. 868–877, 2008.
- KARAN, S.; DASH, P.; KAUSHIK, H.; SAHOO, P.K.; GARG, L.C.; DIXIT, A. Structural and functional characterization of recombinant interleukin-10 from Indian major carp *Labeo rohita*. **Journal of Immunology Research**, p.1-12. 2016.
- KATO, G.; KONDO, H.; AOKI, T.;HIRONO, I. BCG vaccine confers adaptive immunity against *Mycobacterium* sp. infection in fish. **Developmental Comparative Immunology**, v. 34, p. 133-140, 2010.

KLEIN, J.; SATO, A.; NIKOLAIDIS, N. MHC, TSP, and origin of species: from immunogenetics to evolutionary genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 281-304. 2007.

KREUTZ R.; PERSSON, P. B.; KUBITZA, D.; THELEN, K.; HEITMEIER, S.; SCHWERS, M.B.; HEMMRICH. Dissociation between the pharmacokinetics and pharmacodynamics of once-daily rivaroxaban and twice-daily apixaban: a randomized crossover study. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 10, p. 2017-2028, 2017.

LEIRA, M. H.; LAGO, A. A.; VIANA, J. A.; CUNHA, L. T.; MENDONÇA.; FREITAS, R. T. F.. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. **Nutri-time**, v. 14, n. 2, p 1-15, 2017.

LINDQUIST, S. The heat-shock response:ann. ret'. **Biochem.Molecular Cell.**, v. 55, p.1151-1191,1986

LOVOLL, M.; FISCHER, U.; MATHISEN, G. S.; BOGWALD, J. The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, n. 2007, p. 284–295, 2007.

MAGNADOTTIR, B.; JÓNSDÓTTIR, H.; HELGASON, S.; BJÖRNSSON, B.; JORGENSEN, T.O.; PILSTRÖM, L. Humoral immune parameters of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). II. The effects of size and gender under different environmental conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 122B, p. 181-188, 2006.

MARTINS, G. B.; TAROUCO, F.; ROSA, C.E.; ROBALDO, R.B. The utilization of sodium bicarbonate, calcium carbonate or hydroxide in biofloc system: water quality, growth performance and oxidative stress of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquiculture**, v. 468, p. 10-17, 2017.

MEHRABIA, Z.; FIROUZBAKHSH, F.; RAHIMI-MIANJI, G.; PAKNEJAD, H. Immunity and growth improvement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary nettle (*Urtica dioica*) against experimental challenge with *Saprolegnia parasitica*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 104, p. 74-82, 2020.

MEENA, D. K.; DAS, P.; KUMAR, S.; MANDAL, S. C.; PRUSTY, A. K.; SINGH, S. K., AKHTAR, M. S.; BEHERA, K.; PAL, A. K.; MUKHERJEE, S. C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in 326 aquaculture (a review). **Fish Physiology Biochemistry**, v. 39, p. 431-457, 2013.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, A. M.; LOPEZ-RUIZ, A.; BIELEX, E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L, and carp *Cyprinus carpio* L). **The Anatomical Record**, v. 239, p. 468-474, 1994.

MIEST, J. J.; FALCO, A.; PIONNIER, N. P. M.; IRNAZAROW, I.; WILLIAMS, G. T.; HOOLE, D. The influence of dietary beta-glucan, PAMP exposure and *Aeromonas salmonicida* on apoptosis modulation in common carp (*Cyprinus carpio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, p. 846-856, 2012.

MISRA, C. K.; DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; PATTNAIK, P. Effect of multiple injections of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 305-19, 2006.

- NASCIMENTO, D. S. 417 Molecular cloning and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) tumor necrosis factor- α (TNF- α), **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2007, p. 701-710, 2007
- NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. **Journal of Immunotoxicology**, v.5, p. 47-57, 2008.
- NGUYEN, H. T.; NGUYEN, T. T. T.; TSAI, M. A.; ZHEN, E. Y.; WANG, P. C.; CHEN, CHEN, S. C. A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), **Fish and Shellfish Immunology**, v. 65, p. 118-126, 2017.
- NGUYEN, H. T.; NGUYEN, T. T. T.; WANG, Y. T.; WANG, P. C. Effectiveness of formalin-killed vaccines containing CpG oligodeoxynucleotide adjuvants against *Vibrio harveyi* in Orange-spotted grouper. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 68, p. 124-131, 2017.
- PENG, M. Expression of a novel complement C3 gene in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune response and hemolysis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 73, p. 184-192, 2017.
- PETIT, J.; WIEGERTJES, G. F. Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 64, p. 93-102, 2016.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time qPCR-RT. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.
- PITCLLA, A. M.; MENDES, C. G. F.; MENDES, T. F, Imunoprofilaxia da hepatite B. *In*: MENDES, T. F.; PITELLA, A. M. **Recentes avanços em hepatites**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1993. p.183-187.
- PISCICULTURA brasileira produziu 722.560 toneladas em 2018, segundo levantamento da peixe br. São Paulo. 2019
- PRESS, C. M. C. L.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 309–318, 1999.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. São Paulo: [s.n.], 2013. 140 p. [Disponível em Scielo Books].
- RAUTA, P. R.; SAMANTA, M.; DASH, H. R.; NAYAK, B.; DAS, S. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: signaling pathways, expressions and immune responses. **Immunology Letters**, v. 158, p. 14–24, 2014.
- REBOUÇAS, E.; COSTA, J. J. N.; PASSOS, M. J.; PASSOS, J. R. S.; HURK, R. V. D.; SILVA, J. R. V. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Engineering, Technology and Techniques**, Curitiba, v. 56, n. 1, p.31 2013.
- RODRIGUES, F. S.; CHAGAS, S. R.; ROCHA, M. C. V.; NASCENTE, E.P. Sistema imune inato de peixes e o uso do alho como imunoestimulante: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, e152943014, 2020

- ROSS, D. A.; WILSON, M. R.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W.; WARR, G. W. *et. al.* Evolutionary variation of immunoglobulin m heavy chain RNA processing pathways: origins, effects, and implications. **Immunology Reviews**, v.166, p.143–151, 1998.
- SABAT R.; GRUETZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WRITE, E.; WOLK, K.; GEGIMAT, J. Biology of interleukin-10. **Cytokine e Growth Factor Reviews**. v..21, p. 331-344, 2010.
- SAURABH, S. H.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.
- SAVAN, R.; IGAWA, D.; SAKAI, M. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp, *Cyprinus carpio* L. **European Journal of Biochemistry**, p. 4647-4654, 2003.
- SEBASTIÃO, F. A.; FURLAN, L.R.; HASHIMOTO, D.T.; PILARSKI, F. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 6, 2015.
- SECOMBES, C.J.; CHAPPELL. The nonspecific immune system: cellular defenses. *In*: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p. 95-103.
- SECOMBES, C. J.; WANG, T.; BIRD, S. The interleukins of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1336-1345, 2011.
- SHAKYAM, R. S.; 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.
- SHOEMARKER, P. J.; EICHHOLZ, M.; KIM, E.; WRIGLEY, B. Individual and routine forces in gatekeeping. **Journalism and Mass Communication Quarterly**, v. 78, n. 2, p. 233-246, 2001.
- SINYAKOV, M. S. M.; DROR, H. M.; ZHEVELEV, S.; MARGEL, R. R. Avtalion, Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. **Vaccine**, v. 20, p. 3668-3674, 2002.
- STIER, H.; EBBESKOTTE, V.; GRUENWALD, J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. **Nutrition Journal**, n. 38, 2014.
- 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) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2010
- SOUZA, E. M.; SOUZA, R. C.; MELO, J. F. B.; COSTA, M. M.; SOUZA, A. M.; COPATTI, C. E. Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. **Aquiculture**, v. 504, n. 15, p. 7-12, 2019.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: Roca, 2002. 532 p. (Pesquisa veterinária Brasileira).
- TORROBA, M.; ZAPATA, A. G. Aging of the vertebrate immune system. **Microscopy Research Technology**, v. 62, p. 477-481, 2003.
- URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *In*: CYRINO, J. E. P. (ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água**

doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. p. 171-194.

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

VALLEJOS-VIDA, E.; REYES-LÓPEZ, F.; TELES, M.; MACKENZIE. The response of fish to immunostimulant diets. **Imunologia de mariscos e peixes**, v. 56, p. 34-69, 14 set. 2006.

VAN-BEEK, J.; ELWARD, K.; GASQUE, P. Activation of complement in the central nervous system. **The New York Academy Of Science**, v. 992, n. 1, p. 56-71. 2006.

VICENTE, I. S. T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C.E. Prospects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n.4, 2014

VIZONI, S. L.; LIEBER, S. R.; SOUZA, C. A.; SELL, A. M.; VISENTAINER, J. E. L. Papel das citocinas na imunopatogênese da doença do enxerto contra o hospedeiro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, p. 142-152, 2008.

WANG, M.; LU, M. X. Tilapia polyculture: a global review. **Aquaculture Research**, v. 47 p. 2363–2374, 2016.

WANG, P. IL-16 induces intestinal inflammation via PepT1 upregulation in a pufferfish model: new insights into the molecular mechanism of inflammatory bowel disease. **The Journal of Immunology**, v. 191, p. 1413-1427, 2013.

WEI, S. C.; DUFFY, C. R.; ALLISON, J. P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. **Cancer Discovery**, v. 8, p. 1069-1086, 2018.

WEI, P.; ZHU, K.; CAO, J.; DONG, Y.; LI, M.; SHEN, X.; DUAN, Z.; LI, C. The inhibition mechanism of the texture deterioration of tilapia fillets during partial freezing after treatment with polyphenols. **Food Chemistry**, v. 335, 2021.

WHITTINGTON R.; LIM, C.; KLESIOUS, P. H. Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, p. 217-225, 2005.

XIAO-LI, K.; ZHANG, D. F.; LI, Q. Y.; LIU, Z. G.; GAO, F. Y.; LU, M. X.; YANG, H. Digital gene expression analysis in the liver of ScpB-vaccinated and *Streptococcus agalactiae*-challenged Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 94, p. 249-257, 2019.

ZHANG, N. ZHANG, X. J.; CHEN, D. D.; SUNYER, J. O.; ZHANG, Y. A. Molecular characterization and expression analysis of three subclasses of IgT in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 70, p. 94–105, 2017.

ZHAO, X.; FINDLY, R. C.; DICKERSON, H. W. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 500–508, 2008.

ZHU J. J. Transcriptômica análise de perfil de tilápia (*Oreochromis Niloticus*) após streptococcus agalactiae desafio. **Fish and Shell Fish Immunology**, v. 62, p. 202–212, 2017.

ZHU. W. Astragalus polysaccharides, chitosan and poly(I:C) obviously enhance inactivated *Edwardsiella ictaluri* vaccine potency in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 87,p. 379-385, 2019.

ZOU, J. SECOMBES, C. J. Teleost fish interferons and their role in immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1376-1387,2011.