

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Expressão de genes imunes em tambaquis
(*Colossoma macropomum*) desafiados com
*Flavobacterium oreochromis***

Carolina de Souza Pereira

JABOTICABAL, SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Expressão de genes imunes em tambaquis
(*Colossoma macropomum*) desafiados com
*Flavobacterium oreochromis***

Carolina de Souza Pereira

Orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

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

JABOTICABAL, SP

2024

P436e Pereira, Carolina de Souza
Expressão de genes imunes em tambaquis (*Colossoma macropomum*) desafiados com *Flavobacterium oreochromis* / Carolina de Souza Pereira. -- Jaboticabal, 2024
53 f. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal
Orientador: Diogo Teruo Hashimoto
Coorientadora: Silvia Umeda Gallani

1. Desafio bacteriano. 2. Imunogenética. 3. Peixe nativo. 4. RNA-seq. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Expressão de genes imunes em tambaquis (Colossoma macropomum) desafiados com Flavobacterium oreochromis*

AUTORA: CAROLINA DE SOUZA PEREIRA

ORIENTADOR: DIOGO TERUO HASHIMOTO

COORDENADORA: SÍLVIA UMEDA GALLANI

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



Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO (Participação Presencial)
Laboratório de Genética / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP



Prof. Dr. JEFFERSON YUNIS AGUINAGA (Participação Virtual)
Laboratório de Patobiología Acuática / Instituto del Mar del Perú



Prof. Dr. INÁCIO MATEUS ASSANE (Participação Virtual)
. / Faculdade de Ciências Agrárias da UniZambeze

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre ter atendido as minhas preces e ter me dado força para suportar muitos momentos de dificuldade.

Agradeço à minha família, por todo o apoio para que eu continuasse estudando e indo em busca dos meus objetivos, serei eternamente grata principalmente ao meu pai por sempre ter me proporcionado as melhores condições para que eu busque as melhores oportunidades, e por todo suporte, paciência e confiança que sempre foi depositado em mim.

Ao meu namorado Renan Ramos por sempre ficar ao meu lado nos momentos bons e ruins e por me fazer acreditar que eu sou capaz de enfrentar as adversidades, por ser um exemplo de pessoa competente e esforçada. À sua família por ter me acolhido bem e tratado tão bem de mim.

Ao Prof. Dr. Diogo Hashimoto pela orientação e ensinamentos, e por sempre me proporcionar muitas oportunidades que me geram aprendizado e crescimento como pessoa e profissional.

À Prof. Dra. Silvia Gallani por ter me dado a oportunidade de conduzir o experimento em seu laboratório, muito obrigada por todos os ensinamentos em microbiologia e sanidade. Pelos conselhos e pelas oportunidades de participar de trabalhos, mesmo não fazendo parte oficialmente do seu laboratório.

Ao Vito Mastrochirico Filho pela paciência, por ter contribuído bastante para condução desse trabalho e por todo ensinamento nas análises de bioinformática.

Ao Arno por ter paciência em ter me ensinado a realizar extração de RNA e por ter me passado muito conhecimento de bancada, que me fizeram ganhar segurança e mais autonomia.

Aos meus amigos do laboratório de microbiologia Elci, Taisa, Iana, Indra, Matheus, Karen e Bianca por terem sido ótimas companhias e por terem me ajudado nas coletas e aprendizados na microbiologia.

À Carol pelos ensinamentos e dicas nas análises de bioinformática, por ter me auxiliado no preparo das amostras para sequenciamento. Como também pela companhia divertida no laboratório.

Aos meus colegas do Lageac Celma, Raquel, John, Jairo, Baltasar, Marcelo e Shisley pela companhia e compreensão quando não pude participar de manejos devido as minhas análises e processo de escrita.

Aos tabaquis utilizados nesse estudo, suas vidas foram importantes na construção desse conhecimento. O presente trabalho foi realizado com apoio da

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -
Código de Financiamento 001.

APOIO FINANCEIRO

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

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe nativo da região amazônica de grande importância para a aquicultura na América do Sul. No entanto, surtos de bacterioses são considerados uns dos principais entraves para a produção desta espécie. A bactéria *Flavobacterium oreochromis* (anteriormente denominada *Flavobacterium columnare*) está relacionada a elevadas taxas de mortalidade em lotes de tambaquis em fase inicial de produção (até 10 g), o que resulta em perdas econômicas consideráveis. A compreensão dos mecanismos que controlam a imunidade dos peixes diante processos patológicos é um fator fundamental para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas direcionadas para uso na aquicultura. O presente estudo teve como objetivo identificar genes associados à fase aguda de resposta imune de tambaquis infectados com *F. oreochromis*. Para isso, realizamos a extração do RNA total da pele de indivíduos infectados sob 3 condições: assintomáticos (IA) e infectados sintomáticos (IS) após exposição à bactéria, além de um grupo controle (CTR). O RNA-Seq das amostras foi obtido em função da construção de dez bibliotecas de cDNA, sendo 4 para IS, 5 para IA e 1 para o agrupamento CTR. Um total de 24 milhões de leituras foram obtidas por biblioteca, onde sofreram um processo de controle de qualidade. Posteriormente as leituras foram alinhadas ao genoma do tambaqui para análise de expressão diferencial entre as duas condições. Para controlar taxas de falsa descobertas nas análises de expressão diferencial, os p-values foram convertidos para p-ajustados < 0.05 . Um total de 2.470 genes superexpressos e 1.305 subexpressos foram identificados em IS, enquanto 1.358 genes superexpressos e 488 subexpressos foram gerados para IA. Genes superexpressos nas duas condições foram relacionados a processo de autofagia (*atg4b* e *ulk2*), além de genes associados a estresse oxidativo (*klf9*, *ddtit* e *txnip*) regulados pelo mecanismo de proteassomas. Os resultados sugerem a autofagia e outros mecanismos relacionados à homeostase do tambaqui como importantes componentes da defesa imunológica na fase aguda da infecção por *F. oreochromis*.

PALAVRAS-CHAVE: desafio bacteriano, imunogenética, peixe nativo, RNA-Seq

ABSTRACT

The tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a fish native to the Amazon region of importance for aquaculture in South America. However, outbreaks of bacterial diseases are considered one of the main obstacles to the production of this species. The bacterium *Flavobacterium oreochromis* (formerly known as *Flavobacterium columnare*) is associated with high mortality rates in batches of tambaquis in the initial production phase (10 g), resulting in considerable economic losses. Understanding the mechanisms that control fish immunity in the face of pathological processes is a fundamental factor for the development of prophylactic and therapeutic measures for use in aquaculture. This study aimed to identify genes associated with the acute phase of immune response in tambaquis infected with *F. oreochromis*. To do this, we extracted total RNA from the skin of infected individuals under three conditions: asymptomatic (IA) and symptomatic infected (IS) after exposure to the bacterium, as well as a control group (CTR). RNA-Seq of the samples was obtained by constructing ten cDNA libraries, with 4 for IS, 5 for IA, and 1 for the CTR group. A total of 24 million reads were obtained per library, which underwent a quality control process. Subsequently, the reads were aligned to the tambaqui genome for differential expression analysis between the two conditions. To control false discovery rates in the differential expression analyses, p-values were converted to adjusted p-values < 0.05. A total of 2,470 overexpressed genes and 1,305 underexpressed genes were identified in IS, while 1,358 overexpressed genes and 488 underexpressed genes were generated for IA. Genes overexpressed in both conditions were related to autophagy processes (*atg4b* and *ulk2*), as well as genes associated with oxidative stress (*klf9*, *ddtit*, and *txnip*) regulated by the proteasome mechanism. The results suggest autophagy and other mechanisms related to tambaqui homeostasis as important components of the immune defense in the acute phase of *F. oreochromis* infection.

KEY-WORDS: bacterial challenge, immunogenetics, peixe nativo, RNA-Seq

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 Aspectos gerais da aquicultura	11
1.2 Panorama geral da produção do tambaqui	11
1.3 Bacterioses nas pisciculturas: Ênfase para o tambaqui	12
1.4 Etiologia e a nova classificação do gênero <i>Flavobacterium</i> : Ênfase para <i>Flavobacterium oreochromis</i>	13
1.5 Sistema imune de peixes teleósteos	15
1.6 Aplicação da transcriptômica para compreensão da resposta imune induzida por patógeno	16
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 1	26
3. Introdução	28
4. Material e Métodos	29
4.1 Declaração de Ética no Uso de Animais	29
4.2 Desenho experimental e desafio bacteriano	30
4.3 Coleta de amostra, extração e sequenciamento do RNA	31
5. Resultados	33
5.1 Desafio bacteriano	33
5.2 Sequenciamento do RNA	34
5.3 Análises de componentes principais	36
5.4 Identificação de genes diferencialmente expressos	37
5.5 Análise de enriquecimento funcional de genes diferencialmente expressos	38
5.6 Genes diferencialmente expressos	42
6. Discussão	44
6.1 Autofagia	45
6.2 Proteassomas	46
6.3 Interação do Receptor com a Matriz Extracelular (ECM) e Adesão focal	47
7. Conclusão	47
Referências	48

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos gerais da aquicultura

O crescimento populacional tem acarretado diversos desafios que deverão ser enfrentados, dentre eles o aumento da demanda por alimentos saudáveis, que vem sendo associada ao esgotamento de recursos naturais aquáticos em longo prazo. Nesse sentido, a aquicultura se destaca como uma fonte promissora, visando fonte de alimentação oriunda de práticas ambientalmente responsáveis. Além disso, a atividade movimenta a economia por meio de geração de empregos e renda. E essas características são diretamente relacionadas com algumas metas globais dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (Fao, 2022).

Apesar da crise sanitária do COVID-19, o mercado global da aquicultura manteve crescimento estável nos últimos anos. Em 2020 obteve uma produção total de 178 milhões de toneladas de organismos aquáticos, sendo 49% oriundo da aquicultura (Fao, 2022). Desse montante, o continente asiático é responsável por 70 % da produção mundial, seguido pelos países da América, que totalizam 12 % da produção global. Ainda, de acordo com a Fao (2020), é estimado um aumento de 15 % da produção do pescado até 2030.

No cenário brasileiro, as pisciculturas vêm crescendo cada vez mais como um mercado de produção de proteína animal. É estimado que mais de 60 espécies de organismos aquáticos comestíveis são cultivados para comércio no Brasil (Valenti *et al.*, 2021). A maior parte da produção está voltada para a tilápia do Nilo, representando 408.350.403 mil toneladas, seguido do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) (IBGE, 2022).

1.2 Panorama geral da produção do tambaqui

O tambaqui pertencente à família Serrasalmidae, é uma espécie que habita principalmente a bacia dos rios Amazonas e Orinoco (Val & Oliveira, 2021). O cultivo desta espécie se destaca em função das suas características zootécnicas favoráveis, tais como rusticidade, manejo simples, boa disponibilidade de formas juvenis, fácil conversão alimentar e boa adaptação às rações comerciais (Gomes & Silva, 2009; Valladão *et al.*, 2018). É o segundo maior peixe da bacia Amazônica, podendo alcançar um metro de comprimento total e aproximadamente 30 kg (Goulding & Carvalho 1982).

A criação da espécie pode ser realizada em diferentes sistemas de produção como intensivo, semi-intensivo e extensivo (Brasil, 2009). No entanto, predominantemente, sua produção é realizada de forma semi-intensiva, em viveiros escavados, pesando inicialmente 2 g a 5 g e peso final variando de 1 kg a 2,5 kg (Pedroza-Filho *et al.*, 2016). É uma das espécies de maior importância para a região amazônica, que além do seu papel ecológico, é frequentemente explorado na pesca extrativista e aquicultura, sendo também um recurso econômico para diversas comunidades (Oliveira & Val, 2016). Sua demanda como alimento é bastante alta na região norte por fazer parte da culinária regional.

Além de ser a espécie nativa de maior importância para a piscicultura brasileira, apresenta crescente importância no mercado alimentício da América do Sul (Castro *et al.*, 2020; Valladão *et al.*, 2018). Em 2022, a produção nacional do tambaqui alcançou 109.798 toneladas, e apesar de apresentar uma ligeira queda produtiva em comparação à 2021, o tambaqui permanece como a espécie nativa mais cultivada (IBGE, 2022). A produção ocorre principalmente nas regiões de clima quente como Norte e Nordeste, sendo os estados de Rondônia, Roraima, Maranhão, Pará e Amazonas os principais produtores respectivamente (IBGE, 2022).

Embora a espécie demonstre um crescente potencial no mercado alimentício, é válido destacar que a intensificação do cultivo, aliada a práticas de manejo incorretas, pode gerar problemas sanitários para a produção (Tavares-Dias & Martins, 2017). Muitos autores pressupõem que os surtos de doenças têm se tornado um dos principais obstáculos para o desenvolvimento dessa atividade, apesar das produções serem realizadas em regiões de ambiente propício para o cultivo da espécie (Gallani *et al.*, 2021; Valladão *et al.*, 2020; Chagas *et al.*, 2019).

1.3 Bacterioses nas pisciculturas: Ênfase para o tambaqui

As bactérias compõem parte natural da microbiota dos ambientes aquáticos e dos peixes. Podem ser consideradas patógenos oportunistas quando há a proliferação em decorrência do desequilíbrio na tríade patógeno-hospedeiro-ambiente, ocasionado por fatores como negligência no monitoramento da qualidade da água, elevada densidade de estocagem, manejo nutricional inadequado e imunossupressão do hospedeiro (Pavanelli *et al.*, 2008; Austin & Austin, 2007).

Frequentemente são identificadas bactérias como *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium* sp., *Streptococcus agalactiae*, *Lactococcus* sp. e *Francisella* sp. associadas a enfermidades de peixes de água doce (Pereira *et al.*, 2016; Sebastião *et al.*, 2015). Dependendo dos fatores de virulência do patógeno e da resistência do organismo do hospedeiro, a infecção bacteriana pode ocorrer de forma grave, resultando na mortalidade massiva de lotes (Sarkar *et al.*, 2020). Dessa forma, esses microrganismos são considerados problemáticos, pois acarretam a inviabilidade da produção e trazem significativos prejuízos econômicos.

Para as espécies nativas, os registros na literatura sobre quais bactérias apresentam potencial patogênico ainda são considerados escassos. Alguns dos primeiros estudos identificaram cepas do gênero *Flavobacterium* (Pilarski *et al.*, 2008), *Citrobacter* sp., *Edwardsiella tarda* através do isolamento bacteriano no tambaqui (Carvalho, 2012; Pereira *et al.*, 2016). No entanto, apenas a identificação não é suficiente para um microrganismo ser considerado patogênico, sendo necessária a comprovação através do postulado de Koch.

Gallani *et al.* (2020) confirmaram o primeiro patógeno bacteriano do tambaqui, a *Aeromonas hydrophila*, agente etiológico da septicemia hemorrágica, que é uma das principais bacterioses em peixes de produção. Assim como recentemente foi evidenciada para a espécie, a patogenicidade da *Aeromonas veronii* e *Aeromonas hydrophila* provenientes de peixes ornamentais como *Astyanax* sp. e *Trachelyopterus galeatus* (Yunis-Aguinaga *et al.*, 2024). Mielke *et al.* (2022) identificaram a patogenicidade da *Aeromonas jandaei* e *Flavobacterium* sp., e para o tambaqui, e destacaram a *Flavobacterium* como uma das maiores ameaças para a produção da espécie. Reis *et al.* (2023) realizaram o Postulado de Koch com *E. tarda* isolada do tambaqui, mas os peixes infectados não manifestaram sinais clínicos, nem mortalidade. Entretanto, os autores observaram esplenomegalia e áreas esbranquiçadas no baço e nos rins, que na histologia revelaram esplenite granulomatosa, nefrite e hepatite, o que confirma a vulnerabilidade da espécie para mais um patógeno bacteriano.

1.4 Etiologia e a nova classificação do gênero *Flavobacterium*: Ênfase para *Flavobacterium oreochromis*

Bactérias do gênero *Flavobacterium* são caracterizadas como bacilos longos e Gram-negativos, de cuja motilidade ocorre por deslizamento. Suas colônias apresentam características como: diferentes níveis de aderência, coloração amarelada em diferentes

tonalidades, rizoides e não-rizoides, planas e espalhadas (Wakabayashi, 1999; Bernadet & Bowman, 2006; Kuntuu *et al.*, 2011). Podem ocorrer em habitats de água doce (Chen *et al.*, 2018), geleiras (Zhu *et al.*, 2013), sedimentos (Lee *et al.*, 2013), solos (Dong *et al.*, 2003) e, até mesmo, como patógeno em diversas espécies de organismos como plantas (Bernadet & Bowman, 2006), anfíbios (Densmore & Green, 2007), peixes (Lee *et al.*, 2023) e alguns casos em humanos (Tian *et al.*, 2011; Flaherty *et al.*, 1984).

Recentemente LaFrentz *et al.* (2022) detectaram através de análises filogenéticas quatro diferentes grupos dentro da *Flavobacterium columnare*, propondo a reclassificação em quatro novas espécies: *Flavobacterium covae*, *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium davisii* e *Flavobacterium oreochromis*. Apesar da recente mudança de classificação, todas essas cepas são potenciais causadoras da columnariose em diversas espécies de peixes por todo o mundo.

Infecções causadas por *Flavobacterium* são responsáveis por surtos epizoóticos em diversos peixes de água doce como a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Singh *et al.*, 2021), carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) (Neidorf & Morozova, 2021), tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Elgendy *et al.*, 2022) e panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Dong *et al.*, 2015). É considerado um dos agentes patogênicos mais preocupantes na produção de peixes em escala mundial, gerando a inviabilidade da produção e prejuízos econômicos significativos (Loch & Faisal, 2015; Decostere & Devriese, 1998), principalmente para peixes na fase inicial de produção (Lange *et al.*, 2017; Pradhan *et al.*, 2019), de até 10 gramas. Estudos conduzidos por Mielke *et al.* (2022) revelaram 100% de mortalidade por *Flavobacterium columnare* nos lotes de tambaquis na fase juvenil (até 10 gramas) em função do transporte e altas densidades de estocagem.

O estágio juvenil é apontado como a fase de maior vulnerabilidade do peixe à *Flavobacterium*, uma vez que é nesse estágio que o manejo e transporte são realizados de forma intensiva nas produções (Chockmangmeepisan *et al.*, 2020; Hai *et al.*, 2020). A *Flavobacterium* é altamente virulenta e patogênica (Thunes *et al.*, 2022; Kumru *et al.*, 2020; Sundell *et al.*, 2019), por isso, elevadas taxas de mortalidade podem ocorrer em menos de 24 h após a fonte causadora de estresse (Pradhan *et al.*, 2019). Clinicamente, os peixes acometidos pela *Flavobacterium* apresentam letargia, inapetência, nado errático, lesões esbranquiçadas ou acinzentadas no tegumento, principalmente no dorso (em forma de sela) e região caudal, corrosão de nadadeiras e pontos hemorrágicos. Os sinais clínicos podem ser

desencadeados de forma aguda ou crônica, dependendo da virulência da cepa e do status imunológico do organismo (Kumru *et al.*, 2020; Ravindra *et al.*, 2019; Declerq *et al.*, 2015)

1.5 Sistema imune de peixes teleósteos

Assim como em outras espécies de animais, o sistema imune de peixes teleósteos corresponde a um conjunto de componentes celulares e humorais que atuam como mecanismo de defesa quando ocorre a introdução de patógenos, toxinas e/ou diferentes substâncias estranhas no organismo (Mattos *et al.*, 2021; Secombes & Wang, 2012). No entanto, em nível anatômico, o sistema imune de peixes ósseos se difere de mamíferos com base na ausência de linfonodos e a diferente classificação dos órgãos primários e secundários do sistema imune.

Em peixes, o timo e rim anterior apresentam função semelhante à medula óssea nos mamíferos, com capacidade de produzir e amadurecer componentes celulares imunológicos (Steinel & Bolnick, 2017). Os órgãos linfoides secundários compreendem baço e rim, que apresentam a função de recrutamento e proliferação das células imunes quando um patógeno adentra o organismo (Flajnik *et al.*, 2018). Além destas, outras estruturas apresentam função imune e são classificadas como órgãos não linfoides, pois desempenham papel imunológico importante quando ocorre a invasão do patógeno em um determinado tecido, como no caso de órgãos mucosos como: brânquias, nasofaringe, intestino e pele (Buchamann & Secombes, 2022)

A resposta imunológica abrange o sistema imune inato e adquirido, ambos atuando de forma conjunta para debelar patógenos ou estimular processos defensivos através de mecanismos de defesa, mediados por um complexo de células e de fatores humorais (Baldisserotto *et al.*, 2020). O sistema imune inato é reconhecido por ser a primeira linha de defesa de um organismo frente à infecção por um determinado patógeno. É classificado com base em diferentes formas de proteção, denominadas como: barreira física e química (muco, tegumento, escamas, entre outros); barreira celular (macrófagos, monócitos, granulócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos) e barreira humoral (interleucinas, interferon, sistema complemento, enzimas antimicrobianas, entre outros) (Tort *et al.*, 2003; Lieschke & Trede, 2009; Tizard *et al.*, 2013). Já a resposta imune adaptativa ou específica caracteriza-se pela ação de anticorpos específicos, promovendo a memória imunológica. Ao adentrar no organismo, o antígeno é reconhecido e capturado por células apresentadoras de antígenos (APCs). Estas células são conhecidas como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B,

as quais promovem resposta imunológica de memória ou imunidade adquirida (Secombes; Wang, 2012; Baldisserotto *et al.*, 2020).

1.6 Aplicação da transcriptômica para compreensão da resposta imune induzida por patógeno

Estudos sobre a investigação de genes associados à imunidade de peixes teleósteos têm sido conduzidos com o objetivo de compreender a evolução e os mecanismos variados do sistema imunológico nestes animais (Gerdol *et al.*, 2014; Abo-Al-Ela & Haitham, 2018; Chen *et al.*, 2019; Amparyup *et al.*, 2020). A partir disso, é possível identificar características genéticas que regulam a atividade imunológica do hospedeiro frente à infecção por um determinado patógeno, colaborando para o entendimento das respostas celulares e da ativação de vias defensivas desencadeadas durante o processo infeccioso (Li *et al.*, 2021a; Xiong *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2013).

A transcriptômica permite um estudo sistemático e abrangente dos transcritos de RNA produzidos por um organismo, tecido ou célula em um determinado momento. Dessa forma, análises de transcriptoma disponibilizam achados com maior especificidade referentes à mecanismos moleculares que regem o curso de células de defesa, diante da progressão de doenças em peixes (Jia *et al.*, 2021; Ye & Luo., 2018). Existem diferentes ferramentas para análise do transcriptoma, como microarrays e análise serial de expressão gênica (SAGE). As quais foram aplicadas principalmente em espécies mais estudadas como o salmão-do-atlântico (Eslamloo *et al.*, 2020; Xue *et al.*, 2021), truta arco-íris e peixe-zebra (Stockhammer *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2006). No entanto, estes métodos apresentam algumas limitações para transcriptoma de peixes como por exemplo, é necessário ter o genoma de referência da espécie, além disso são também considerados trabalhosos e de alto custo (Qian *et al.*, 2014).

A técnica de RNA-Seq, por sua vez, pode apresentar diversas aplicações. Uma das suas principais vantagens é a possibilidade de realizar análises em espécies de peixes com informações genômicas ainda desconhecidas. Além disto, permite identificar com maior sensibilidade a modulação da expressão de genes associados à resposta imune de organismos acometidos por processos infecciosos oriundos de diversos agentes etiológicos, tais como identificar diferentes isoformas de transcritos, diferentes padrões de splicing e novas unidades de transcrição (Li *et al.*, 2021b; Sudhagar; Kumar; El-Matbouli, 2018; Xiang *et al.*, 2010). Embora, de forma indireta, o conhecimento de mecanismo moleculares frente a

bacterioses podem colaborar para o desenvolvimento de métodos profiláticos mais efetivos como o desenvolvimento de vacinas, imunostimulantes e imunomoduladores.

Para espécies de peixes nativos, há uma lacuna de informações sobre os mecanismos imunes de peixes acometidos por bacterioses. Ensaio conduzido recentemente por Mastrochirico-Filho *et al.* (2020) caracterizaram o perfil de transcriptoma associado à resposta imune de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados experimentalmente por *Aeromonas hydrophila*. O estudo empregou a técnica do RNA-Seq, permitindo identificar o curso da resposta imune do pacu durante fases críticas da infecção, bem como os dados sobre os níveis de expressão gênica durante a infecção, contribuindo para identificação de famílias de pacu naturalmente resistentes a esta bacteriose.

Diante da problemática oriunda de surtos de bacterioses associados à *F. oreochromis* em tambaquis, principalmente em lotes de alevinos, analisar o perfil imunológico através de transcriptoma pode proporcionar informações relevantes e ainda desconhecidas sobre o curso do sistema imunológico desta espécie frente à infecção pela *F. oreochromis*. Este estudo poderá colaborar para pesquisas subsequentes acerca do desenvolvimento de protocolos profiláticos e terapêuticos de forma mais direcionada para uso nesta espécie.

2. OBJETIVO GERAL

Identificar através da análise de transcriptoma por meio do RNA-Seq, genes associados à resposta imune durante a fase aguda de infecção por *Flavobacterium oreochromis* em tambaquis.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar infecção experimental com a *F. oreochromis*
- Analisar a expressão gênica diferencial de indivíduos sintomáticos e assintomáticos
- Identificar os genes subexpressos e superexpressos relacionados a resposta imune de indivíduos sintomáticos e assintomáticos.
- Realizar análises de enriquecimento funcional dos principais genes através de banco de dados que permitem categorizar genes com base em suas funções biológicas.

REFERÊNCIAS

- Abo-Al-Ela., Haitham, G. An introduction to selected innate immunerelevant genes in fish., 2018. *Ecology and environmental research*. 16(2):955-976.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3), 403–410.
- Amparyupa, P., Charoensapsria, W., Samalukac, N., Chumtonga, P., Yocawibuna, P., Imjongjirak, C., 2020. Transcriptome analysis identifies immune-related genes and antimicrobial peptides in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Fish and Shellfish Immunology*. 99, 403-413.
- Andrews, S., 2010. Fast QC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. 25(1), 25–29.
- Austin, B., Austin, D. A., 2007. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish, Godalming, *Springer*. p. 337–404.
- Baldisserotto, B., Urbinati, E, C., Cyrino, J. E. P., 2020. Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish. Elsevier Inc.
- Bayne, C. J., Gerwick, L., 2001. *Developmental and Comparative Immunology*, 725 – 743.
- Bernardet, J., Nakagawa, Y., 2006. An Introduction to the Family Flavobacteriaceae. *Prokaryotes*, 7:455-480.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30(15), 2114–2120.
- Brasil. Resolução CONAMA nº 413 de 26 de junho de 2009., 2009. Estabelece normas e critérios para o licenciamento ambiental da aquicultura, e dá outras providências. Brasília/DF: Diário Oficial da União.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., Pachter, L., 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* 34(5), 525–527.
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Lee, T. J., Leigh, N. D., Kuo, T., Davis, F. G., Bateman, J., Bryant, S., Guzikowski, A. R.,

- Tsai, S. L., Coyne, S., Ye, W. W., Freeman, R. M., Peshkin, L., Tabin, C. J., Regev, A., Haas, B. J., Whited, J. L., 2017. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Reports*. 18(3), 762–776.
- Bowden, T. J., Thompson, K. D., Morgan, A. L., Gratacap, R. M. I., Nikoskelainen, S., 2007. Seasonal variation and the immune response: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 695 – 706.
- Buchmann, K., Secombes, C. J., 2022. Principles of Fish Immunology. *Springer Nature*.
- Castro, D. R. C.; Brabo, M. F.; Rocha, R. M. da; Campelo, D. A. V.; Veras, G. C.; Rodrigues, R. P. Production cost and profitability of the creation of tambaqui *Colossoma macropomum* in the state of Pará, Amazon, Brazil. *Research, Society and Development, [S. l.]*, v. 9, n. 9.
- Chagas, E. C., Pereira, S. L. A., Benavides, M. V., Brandao, F. R., Monteiro, P. C., Maciel, P. O. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. *Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 2019.
- Chagas, E. C., Majolo, C., & Fujimoto, R. Y., 2014. Isolamento e caracterização de *Flavobacterium columnare* de tambaqui (*Colossoma macropomum*). In Embrapa Amazônia Ocidental-Resumo em anais de congresso (ALICE). Trabalho apresentado no 13º Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Aracaju.
- Chen, M., Liu, S., Yan, F., Zhou, E., Zhong, X., Ding, M., Ye, J., 2019. Complement 1q-binding protein from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular characterization, expression pattern upon bacterial infection and its binding properties. *Aquaculture*. 500, 31- 40.
- Chen, W., Su, C., Kwon, S., Sheu, S, 2018. International Journal Systematic Evolutionary Microbiol. 68:3111–3117.
- Declercq, A. M, Haesebrouck, F., Broeck, W. V., Bossier, P., Decostere, A., 2013. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research*. 44-27.

- Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L. A., 1998. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. *Veterinary Microbiology*. 62, 35-45.
- Densmore, C. L., Green, D. E., 2007. Diseases of Amphibians. Volume 48, Number 3
- Dong, K., Chen, F., Du, Y., Wang, G., 2013. *Flavobacterium hauense* sp. nov., isolated from soil and emended descriptions of *Flavobacterium subsaxonicum*, *Flavobacterium beibuense* and *Flavobacterium rivuli*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 886–892.
- Flajnik, M. F., 2018. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 18(7):438–453.
- Filho, M. X. P., Filho, J. B. S. F., Júnior, M. A. G. P., 2020. Impactos socioeconômicos da aquicultura no Brasil: Análise a partir da matriz de contabilidade social. *Revista Econômica do Nordeste*. (51) 4, 159-176.
- Gerdol, M., Buonocore, F., Scapigliati, G., Pallavicin, A., 2014. Analysis and characterization of the head kidney transcriptome from the 3 Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (Teleostea, Notothenioidea): A source for immune relevant genes. *Marine Genomics*.
- Gomes, L. C., & Silva, C. R., 2009. Impact of pond management on tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier), production during growth-out phase. *Aquaculture Research*, 40(7), 825-832.
- Goulding, M.; Carvalho, M. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 107–133.
- Groff, J. M., 2001. Veterinary clinics of North America: Exotic Animal Practice. 4, 321-411.
- Hameda, S. B., Ranzani-Paiva, M. J. T., Tachibana, L., Dias, D. C., Ishikawa, C. M., Esteban, M. A., 2018. Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish and Shellfish Immunology*. 550-562.

- Huang, Y., Zheng, Q., Wang, Z., Tang, J., Lu, Y., Qin, Q., Cai, J., Jian, J., 2021. Fish natural killer enhancing factor-A (NKEF-A) enhance cytotoxicity of nonspecific cytotoxic cells against bacterial infection, *Molecular Immunology*, Volume 133, Pages 184-193.
- Ibge (2022). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>
- Jia, Y., Li, Z., Du, Q., Chang, Z., 2021. Transcriptome analysis of immune-related gene expression in Yellow River carp (*Cyprinus carpio var.*) after challenge with *Flavobacterium columnare*. *Microbial Pathogenesis*. 160, 105148.
- Jiang, H., Wang, M., Fu, L., Zhong, L., Liu, G., Zheng, Y., Chen, X., W., 2020. Liver transcriptome analysis and cortisol immune-response modulation in lipopolysaccharide-stimulated in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish Shellfish Immunology*. 101, 19–50
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M., 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*. 40(D1), 109–114.
- Kunttu, H. M. T., Valtonen, E. T., Jokinen, E. I., Suomalainen, L., 2009. Saprophytism of a fish pathogen as a transmission strategy. *Epidemics*. 96-100.
- LaFrentz, B. R., Králová, S., Burbick, C. R., Alexander, T. L., Phillips, C. W., Griffin, M. J., Waldbieser, G. C., García, J. C., Sebastião, F. A., Soto, E., Loch, T. P., Liles, M. R., Snekvik, K. R., 2022. The fish pathogen *Flavobacterium columnare* represents four distinct species: *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium covae* sp. nov., *Flavobacterium davisii* sp. nov. and *Flavobacterium oreochromis* sp. nov., and emended description of *Flavobacterium columnare*. *Systematic and Applied Microbiology*, Volume 45, Issue 2.
- Lange, M. D., Farmer, B. D., Declercq, A. M., Peatman, E., Decostere, A., & Beck, B. H., 2017. Sickeningly Sweet: L-rhamnose stimulates *Flavobacterium columnare* biofilm formation and virulence. *Journal of fish diseases*. 40(11), 1613-1624.
- Langmead, B., Salzberg, S. L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie. *Nature methods*. 9(4), 357–359.
- Lee, K., Park, S., Yi, H., Chun, J. *Flavobacterium limnosediminis* sp. nov., isolated from sediment of a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2013), 63, 4784–4789.

- Li, F., Liu, X., Ge, H., Huang, J., Zhang, Y., Wang, Z., 2021a. Transcriptome profiling and differential expression analysis of the immune-related genes during the early phase of acute infection with *Aeromonas hydrophila* in the Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). *Aquaculture*. 545(15).
- Li, M., Xu, C., Li, D., Wu, G., Wu, G., Yang, C., Pan, Y., Pan, Z., Tan, G., Liu, Y., 2021b. Transcriptome analysis of the spleen provides insight into the immunoregulation of *Cyprinus carpio koi* under *Aeromonas veronii* infection. *Aquaculture*. 540.
- Lieschke, G. J., Trede, N. S., 2009. Fish Immunology. *Current Biology*. 19(16).
- Loch T. P., Faisal M., 2014. Emerging flavobacterial infections in fish: A review, *J Adv Res*.
- Mattos, B. O., Lima-Pantoja, J., Oliveira, A, T., Aride, P, H, R., 2021. Aquicultura na Amazônia: Estudo técnico científico e difusão de tecnologias. Atena Editora.
- Mastrochirico-Filho, V. A., Hata, M. E., Kuradomi, R. Y., Freitas, M, V., Ariede, R. B., Pinheiro, D. G., Robledo, D., Houston, R., Hashimoto, D. T., 2020. Transcriptome profiling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*: Inference on immune gene response. *Frontiers in Genetic*.
- Mielke, T. D., Francisco, C. J., Dorella, F.A., Figueiredo, H. C. P., Tavares, G. C., Gallani, S. U., 2022. The strategic use of water additives for tambaqui *Colossoma macropomum* transport: New insights of bacteriosis and productivity approach. *Aquaculture*, Volume 558.
- Olivares, J., Schmachtenberg, O. 2019. An update on anatomy and function of the teleost olfactory system. *PeerJ* 7:e7808.
- Pant, A., Yao, X., Lavedrine, A., Viret, C., Dockterman, J., Chauhan, S., Shi, C., Manjithaya, R., Cadwell, K., Kufer, T. A., Kehrl, J. H., Coers, J., L., Sibley, D. L., Faure, M., Taylor, G. A., Chauhan, M. A., 2022 Interactions of Autophagy and the Immune System in Health and Diseases, *Autophagy Reports*, 1:1, 438-515.
- Pavanelli, G. C., Eiras, J. D. C., & Takemoto, R. M., 2008. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. In *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*.
- Peatman, E., Baoprasertkul, P., Terhune, J., Xu, P., Nandi, S., Kucuktas, H., Li, P., Wang, S., Somridhivej, B., Dunham, R., Liu, Z., 2007. Expression analysis of the acute phase

response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium. *Developmental & Comparative Immunology*, Volume 31, Issue 11.

Pereira, S. L. A., Chagas, E. C., Maciel, P. O., Benavides, M. V., Majolo, C., Boijink, C. L., Tavares-Dias, M., Ishikawa, M. M., Fujimoto, R. Y., Brandão, F. R., Sousa, K. L., Morais, M. S., Martins, V. F. S., 2016. Agentes Patogênicos de Tambaquis Cultivados, com Destaque para Registros em Rio Preto da Eva, AM. Embrapa Amazônia Ocidental.

Pilarski, F., Ishikawa, M., de Pádua, S. B., & Sakabe, R., 2011. Columnariose: etiologia, sinais clínicos e envio de amostras para análise laboratorial. Embrapa Agropecuária Oeste Documentos (INFOTECA-E).

Pilarski, F., Rossini, A. J., & Ceccarelli, P. S., 2008. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68(2), 409-414.

Pradhan, P. K., Paria, A., Pande, V., Verma, D. K., Arya, P., Rathore, G., & Sood, N., 2019. Expression of immune genes in Indian major carp, *Catla catla* challenged with *Flavobacterium columnare*. *Fish & shellfish immunology*. 94, 599-606.

Reis, F. Y. T., Rocha, V. P., Janampa-Sarmiento, P. C., Costa, H. L., Egger, R. C., Passos, N. C., Figueiredo, H. C. P. (2023). *Edwardsiella tarda* in Tambaqui (*Colossoma macropomum*): A Pathogenicity, Antimicrobial Susceptibility, and Genetic Analysis of Brazilian Isolates. *Animals*, 13(18), 2910.

Rivas-Aravena, A., Fuentes-Valenzuela, M., Escobar-Aguirre, S., Gallardo-Escarate, C., Molina, A., Valdés, J. A., 2019. Transcriptomic response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skeletal muscle to *Flavobacterium psychrophilum*, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*.

Sackar, P., Isaac, P. K., Raju, S. V., Elumalai, P., Arshad, A., Arockiaraj, J., 2021. Pathogenic bacterial toxins and virulence influences in cultivable fish. *Aquaculture Research*. 52, 2361–2376.

Secombes, C. J., Wang, T., 2012. The innate and adaptive immune system of fish. Woodhead Publishing Limited.

- Sebastião, F. A., Furlan, L. R., Hashimoto, D. T., Pilarski, F. 2015. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. *Advances in Microbiology*. 5, 409-424.
- Sebastião, F. A., Pilarski, F., Lemos, M. V. F., 2010. Isolation and molecular characterization of *Flavobacterium columnare* strains from fish in Brazil. *Journal of Bacteriology Research*, 2(3), 22-29.
- Singh, S., Mallik, S. K., Kala, K., Shahi, N., Pathak, R., Giri, A. K., Chandra, S., Pant, L., Patiyl, R. S., 2021. Characterization of *Flavobacterium columnare* from farmed infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) of Central Indian Himalayan region, India, *Aquaculture*, Volume 544, 737118, ISSN 0044-8486.
- Smith-Unna, R., Boursnell, C., Patro, R., Hibberd, J. M., Kelly, S., 2016. TransRate: reference free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Research*. 26(8), 021626.
- Steinel, N. C, Bolnick, D. I., 2017. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Front Immunol* 8:827.
- Sudhagar, A., Kumar, G., El-Matbouli, M., 2018. Transcriptome Analysis Based on RNA-Seq in Understanding Pathogenic Mechanisms of Diseases and the Immune System of Fish: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Science*.
- Tavares-Dias, M., Martins, M, L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*. 41(4):913–918.
- Tian., G. Z., Piao, D. R., Zhao, H. Y., Jiang, H., Cui, B. Y., Li, J, Y., 2011. A *Flavobacterium lindanitolerans* strain isolated from ascites sample of a chinese patient with EV71 virus infection. Volume 24, Issue 6, Pages 694-696.
- Tizard I., 2013. *Veterinary Immunology*. Elsevier Inc. 9th edition.
- Tort, L., Balasch, J. C., Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia*, 22 (3), 277-286.
- Qian, X., Ba, L. Y., Zhuang, Q., Zhong, G., 2014. RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. *A Journal of Integrative Biology*. 18.
- Val, A. L., Oliveira, A. M., 2021. *Colossoma macropomum* - A tropical fish model for biology and aquaculture. *Jez-A Ecological and Integrative Pshysiology*.

- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 351-369.
- Valenti, W. C., Barros, H. P., Moraes-valenti, P., Bueno, G. W., & Cavalli, R. O., 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports*, 19, 100611.
- Ye, H., Lin, Q., Lu, H., 2018. Applications of transcriptomics and proteomics in understanding fish immunity. *Fish and Shellfish Immunology*. v. 17. p. 319-327.
- Xiang, L. X., He, D., Dong, W., Zhang, Y., Shao, J., 2010. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of bacteria-challenged *Lateolabrax japonicus* reveals insight into the immunerelevant genes in marine fish. *BMC genomics*.427.
- Xiong, N., Ou, J., Fan, L., Kuang, X., Fang, Z., Luo, S., Mao, Z., Liu, S., Wang, S., Wen, M., Luo, K., Hu, F., Wu, C., Liu, Q., 2022. Blood cell characterization and transcriptome analysis reveal distinct immune response and host resistance of different ploidy cyprinid fish following *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 120, 547-559.
- Wakabayashi, H., 1991. Effect of environmental conditions on the infectivity of *Flexibacter columnaris* to fish. *Journal of Fish Diseases*, 14, 279-290.
- Zhu, L., Liu, H., Zhang, J., Dong, X., Zhou, Y., Xin, Y., 2013. *Flavobacterium noncentrifugens* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from glacier meltwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2032–2037
- Zhu, L., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L., Shao, J., 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology*. 39-62.

CAPÍTULO 1

Differential expression of the immune-related genes during early phase of acute infection with *Flavobacterium oreochromis* in tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Carolina de Souza Pereira¹, Vito Antonio Mastrochirico-Filho^{1,2}, Elcimara Cardoso Pereira³, Arno Juliano Butzge¹, Silvia Umeda Gallani³, Diogo Teruo Hashimoto¹

¹ São Paulo State University (Unesp), Aquaculture Center of Unesp, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil,

² Campus of Bauru, São Paulo state, Brazil. Faculty of Sciences, São Paulo State University.

³ Laboratory of Applied Microbiology to Aquatic Organisms, Nilton Lins University, 69058-030, Manaus, AM, Brazil

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe nativo da região amazônica de grande importância para a aquicultura na América do Sul. No entanto, surtos de bacterioses são considerados uns dos principais entraves para a produção desta espécie. A bactéria *Flavobacterium oreochromis* (anteriormente denominada *Flavobacterium columnare*) está relacionada a elevadas taxas de mortalidade em lotes de tambaquis em fase inicial de produção (até 10 g), o que resulta em perdas econômicas consideráveis. A compreensão dos mecanismos que controlam a imunidade dos peixes diante processos patológicos é um fator fundamental para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas direcionadas para uso na aquicultura. O presente estudo teve como objetivo identificar genes associados à fase aguda de resposta imune de tambaquis infectados com *F. oreochromis*. Para isso, realizamos a extração do RNA total da pele de indivíduos infectados sob 3 condições: assintomáticos (IA) e infectados sintomáticos (IS) após exposição à bactéria, além de um grupo controle (CTR). O RNA-Seq das amostras foi obtido em função da construção de dez bibliotecas de cDNA, sendo 4 para IS, 5 para IA e 1 para o agrupamento CTR. Um total de 24 milhões de leituras foram obtidas por biblioteca, onde sofreram um processo de controle de qualidade. Posteriormente as leituras foram alinhadas ao genoma do tambaqui para análise de expressão diferencial entre as duas condições. Para controlar taxas de falsa descobertas nas análises de expressão diferencial, os p-values foram convertidos para p-ajustados < 0.05 . Um total de 2.470 genes superexpressos e 1.305 subexpressos foram identificados em IS, enquanto 1.358 genes superexpressos e 488 subexpressos foram gerados para IA. Genes superexpressos nas duas condições foram relacionados a processo de autofagia (*ATG4B* e *ULK2*), além de genes associados a estresse oxidativo (*KLF9*, *DDIT1* e *TXNIP*) regulados pelo mecanismo de proteassomas. Os resultados sugerem a autofagia e outros mecanismos relacionados à homeostase do tambaqui como importantes componentes da defesa imunológica na fase aguda da infecção por *F. oreochromis*.

PALAVRAS-CHAVE: desafio bacteriano, imunogenética, peixe nativo, rna-seq

3. Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um pescado de crescente importância no mercado alimentício da América do Sul (Valladão *et al.*, 2018). É considerada a segunda espécie mais cultivada no Brasil, com uma produção anual em torno de 109.798 toneladas. A produção ocorre principalmente nas regiões de clima quente como Norte e Nordeste do Brasil, sendo os estados de Rondônia, Roraima, Maranhão, Pará e Amazonas os principais produtores respectivamente (IBGE, 2022).

O cultivo desta espécie se destaca em função das suas características zootécnicas favoráveis, tais como rusticidade, manejo simples, fácil conversão alimentar e boa adaptação às rações comerciais (Gomes & Silva, 2009; Valladão *et al.*, 2018). No entanto, a intensificação do cultivo aliada a práticas de manejo incorretas tem gerado problemas sanitários como bacterioses e parasitoses para a produção (Tavares-Dias & Martins, 2017).

As bactérias do gênero *Flavobacterium* são consideradas um dos patógenos mais emergentes em escala mundial, causando a inviabilidade da produção e resultando em prejuízos econômicos significativos para a aquicultura (Loch & Faisal, 2015; Decostere & Devriese, 1998). Surtos causados por essas bactérias acometem principalmente peixes na fase inicial de produção (Lange *et al.*, 2017; Pradhan *et al.*, 2019). Infecções causadas por este patógeno tem sido registrada em várias espécies de peixes de água doce de importância comercial, incluindo a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Singh *et al.*, 2021), carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) (Neidorf & Morozova, 2021), tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Elgendy *et al.*, 2022) e panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Dong *et al.*, 2015).

Recentemente, Mielke *et al.* (2022) identificaram a patogenicidade da *Flavobacterium* sp. em tambaqui, e destacaram a *Flavobacterium* como uma das maiores ameaças para a produção da espécie. Além disso revelaram 100% de mortalidade de lotes de tambaquis na fase juvenil (até 10 gramas) por *Flavobacterium*, em função do transporte e altas densidades de estocagem (Mielke *et al.*, 2022). Clinicamente, os peixes acometidos pela *Flavobacterium* apresentam lesões esbranquiçadas ou acinzentadas no tegumento, principalmente no dorso (em forma de sela) e região caudal e corrosão de nadadeiras. Os sinais clínicos causados pela *Flavobacterium* podem ser desencadeados de forma aguda ou crônica, dependendo da virulência da cepa e do status imunológico do organismo (Kumru *et al.*, 2020; Ravindra *et al.*, 2019; Declerq *et al.*, 2015).

Para uma melhor compreensão da resposta imune de peixes teleósteos, principalmente frente à introdução de patógenos, análises de transcriptoma podem fornecer

informações detalhadas sobre os mecanismos moleculares sinalizadores na ativação da imunidade em diferentes estágios de infecção em peixes. Com isso, o conhecimento de mecanismos imunogenéticos frente a bacterioses podem colaborar para o desenvolvimento de efetivos métodos profiláticos, como o desenvolvimento de vacinas, imunostimulantes, imunomoduladores e seleção genética de animais resistente à patógenos (Sudhagar *et al.*, 2018; Ye & Luo, 2018).

Mecanismos moleculares que regem a progressão da resposta imune frente à infecção por *Flavobacterium* têm sido investigados em diferentes espécies de peixes (Tonsgrri *et al.*, 2020; Ravindra *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2013). Através de análises de transcriptoma, Zhao *et al.* (2016) identificou processos biológicos envolvidos na defesa imune frente à *Flavobacterium columnare* em peixe-alburno (*Culter alburnos*). O estudo revelou mecanismos de fagocitose como uma das principais estratégias para eliminar o patógeno, elucidando também o mecanismo do patógeno na modulação da resposta imune do hospedeiro. Colaborando para o entendimento de mecanismo dessa infecção na interação patógeno-hospedeiro. Peatman *et al.* (2013) analisaram o perfil de genes diferencialmente expressos em bagres (*Ictalurus punctatus*) susceptíveis e resistentes à infecção por *F. columnare*. Os resultados demonstraram que animais susceptíveis apresentavam fenótipo putativo mucossecretor e tolerogênico que pode estar envolvido na predisposição à infecção por *F. columnare*.

Diante da problemática oriunda de surtos de bacterioses associados à *Flavobacterium oreochromis* em tambaquis, principalmente em lotes de alevinos, análises do perfil imunológico através de transcriptoma podem proporcionar informações relevantes e ainda desconhecidas sobre a dinâmica do sistema imunológico desta espécie frente à infecção pela *F. oreochromis*. Portanto, o objetivo desse estudo consiste em realizar através da análise de transcriptoma por meio do RNA-Seq, a expressão diferencial de genes associados à resposta imune, durante a fase aguda de infecção por *F. oreochromis* em tambaquis.

4. Material e Métodos

4.1 Declaração de Ética no Uso de Animais

Este estudo foi conduzido de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, Brasil) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, Brasil) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da

Universidade Nilton Lins sob o protocolo 008/2021. Todos os procedimentos de biossegurança foram realizados para a manipulação de cepas bacterianas e animais infectados.

4.2 Desenho experimental e desafio bacteriano

Os animais foram adquiridos de uma piscicultura comercial, com peso médio de 1-3 g, e mantidos em caixas com capacidade de 1000 L provida de aeração constante, renovação parcial da água (30%) diariamente e oferta de ração comercial três vezes ao dia. Anterior ao desafio, uma subamostra de animais fora previamente examinada quanto á bacterioses e parasitoses.

A infecção experimental foi conduzida com a cepa de *Flavobacterium oreochromis* (AMFO 04), isolada de tambaquis com histórico da doença identificada por MALDI-ToF (Assis et al., 2017) e previamente certificada quanto à patogênese através do postulado de Koch. A reativação da cepa (armazenada à -80 °C, em caldo G enriquecido com 30 % de glicerol) foi realizada em meio ágar G (25 °C por 48 horas). Então, as colônias foram inoculadas no caldo G estéril e incubadas sob agitação (100 rpm a 28°C/ 48 h). Após o crescimento bacteriano, o meio de cultura foi centrifugado em 4°C/ 3000g/ 10 min, e o pellet bacteriano ressuspendido em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) O plaqueamento das diluições seriados (100 µl) foi realizado em duplicata para constatar a concentração do inóculo bacteriano em unidade formadora de colônias (UFC/mL).

A dose letal em 50% dos indivíduos (DL₅₀) foi estabelecida com base em experimentos anteriores através das concentrações ajustadas nas densidades óptica (DO₆₂₅) de: 0 (controle com PBS), 0.226, 0.414, 0.590, 0.779 e 1.182 nm. Testadas por via intraperitoneal, em 60 indivíduos separados aleatoriamente, 10 indivíduos para cada concentração. Anterior à inoculação da bactéria, os indivíduos foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína 100 mg/L.

Com base na definição da DL₅₀, iniciou-se o desafio bacteriano com a *F. oreochromis*, onde o inóculo foi injetado na dose 1.19×10^9 UFC/mL, por via intraperitoneal (0,1 mL do inóculo para cada 10 gramas de peso vivo). Indivíduos do grupo controle também foram manejados sob as mesmas condições, mas injetados com PBS.

No desenho experimental do desafio bacteriano, um total de 108 indivíduos com peso médio de $6,84 \pm 1,8$, foram alocados em um sistema estático, com 6 caixas plásticas com capacidade de 80 L, providas de aeração constante e realizada trocas parciais de água (30%

do volume por dia). Sendo distribuídas 3 caixas para o grupo infectados e 3 caixas para o grupo controles, cada caixa povoada com 18 indivíduos. Os parâmetros de qualidade da água tais como oxigênio dissolvido ($6,27 \pm 0,60$), temperatura ($25,5 \pm 0,24$) e pH ($6,96 \pm 0,24$) mostraram-se dentro das exigências para a espécie durante o período experimental.

A mortalidade e a progressão dos sinais clínicos foram observadas três vezes ao dia durante 72 horas. Indivíduos recém-mortos foram submetidos à necropsia seguida de reisolamento bacteriano e identificação por MALDI-ToF (Assis *et al.*, 2017) para confirmação diagnóstica.

4.3 Coleta de amostra, extração e sequenciamento do RNA

Indivíduos que apresentaram sinais clínicos característicos da infecção por *F. oreochromis* foram considerados - Indivíduos Sintomáticos (IS) e indivíduos sem sinais clínicos - Indivíduos Assintomáticos (IA), além dos indivíduos do grupo controle (CT). A coleta de amostras para sequenciamento de RNA foi realizada durante o período de 48 h, devido à alta ocorrência de mortalidade. Previamente, os animais foram eutanasiados em overdose de benzocaína (0,3 g/L), em seguida amostras de pele foram coletadas de indivíduos infectados (6 amostras IS e outras 6 amostras IA) e controle (6 amostras), totalizando 2 indivíduos por unidade experimental. A coleta foi realizada simultaneamente em todos os grupos, no período com a maior taxa de mortalidade de indivíduos sintomáticos.

A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Para quantificação do RNA total foi utilizado o kit Qubit RNA em um Flurômetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A integridade do RNA verificada através de eletroforese em gel a 1.5%, através da identificação das bandas 28S e 18S, respectivamente. E a pureza da amostra foi averiguada através do NanoDrop One (ThermoFisher, CA, USA).

Aproximadamente 1 µg de RNA total de cada amostra foi selecionado para construção das bibliotecas. Para obtenção somente de RNAm, foi empregado o método de seleção através da cauda poli A, otimizado com uso de oligoDT. As amostras foram convertidas em cDNA e a construção das bibliotecas de cDNA foi conduzida através do protocolo DNBSEQ Eukaryotic Strand-specific mRNA library. O sequenciamento ocorreu através da plataforma DNBseq.

No total, foram criadas 10 bibliotecas de cDNA, 5 bibliotecas correspondentes ao grupo de indivíduos assintomáticos (IA), 4 bibliotecas correspondentes ao grupo de indivíduos sintomáticos (IS) e ao mesmo tempo foram criadas bibliotecas para o grupo de controle (CTR) a partir da combinação de 5 amostras agrupadas, diluídas na mesma concentração. O número de bibliotecas do grupo IS foi reajustado, devido uma amostra não apresentar parâmetro adequado no teste de controle de qualidade, portanto foi retirada para não prejudicar as análises posteriores.

4.4 Controle de qualidade e alinhamento das leituras

A qualidade dos dados brutos de sequenciamento foi inicialmente verificada através do software FASTQC v. 0.11.9 (Andrews, 2010). Consequente, a remoção de leituras de menor qualidade ($Q\text{ Phred} < 30$) e remoção de adaptadores Illumina foi realizada por meio do software FASTP (Chen et al., 2018). Apenas leituras de pares superiores a 36 pb foram mantidas.

O mapeamento das leituras de alta qualidade geradas no experimento foi realizada através do software STAR (Dobin *et al.*, 2013). O STAR funciona em dois passos principais: (i) É realizada uma busca sequencial por um valor máximo de *seeds* mapeáveis de cada transcrito, com base em um genoma de referência. (ii) Em seguida, o STAR constrói um alinhamento de todas as sequências a partir da junção das *seeds* que foram alinhadas contra o genoma de referência. Para esse estudo utilizamos o genoma de referência do tambaqui (*Colossoma macropomum*) como modelo (NCBI: GCA_904425465.1).

Após o mapeamento, a abundância relativa dos transcritos para cada condição foi contabilizada a partir do software RSEM (Li & Dewey, 2011). A abundância dos transcritos foi estimada utilizando o algoritmo de expectativa-maximização (EM), selecionando como parâmetro padrão a opção “- - paired-end” e tendo como base o arquivo de anotação de genes (gff) e sequências do genoma do tambaqui (fasta). Através do RSEM foi gerado um conjunto de sequências de transcritos de referência. Em seguida, o conjunto de *reads* de RNA-Seq foi alinhado aos transcritos de referência. Os alinhamentos produzidos pelo RSEM foram aplicados na inferência de abundância de transcritos por milhões (TPM). Intervalos de credibilidade a 95% são obtidos a partir de uma abordagem bayesiana implementada no RSEM.

4.5 Análise de genes diferencialmente expressos

As estimativas de abundância de transcritos, a caracterização de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada utilizando o software DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Para controlar as taxas de falsas descobertas (FDR) de testes de hipóteses múltiplas, os p-valores calculados pelo DESeq2 foram convertidos em q-valores. Em seguida, foi gerada a lista de transcritos diferencialmente expressos com valores de corte q inferiores a 0,05 e log2FC (mudança de dobra (tratamento/controle) para um gene) > 1 ou log2FC < -1) conforme descrito em estudos de transcriptoma semelhantes (Marancik *et al.*, 2015; Polinski *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2020).

Uma análise de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos nas diferentes condições foi realizada por meio do software SHINYGO (Ge *et al.*, 2020). As categorias Gene Ontology (GO) e bancos de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) foram usados para atribuir funções e rotas metabólicas nos quais os transcritos foram inseridos. O *fold enrichment* foi utilizado para quantificar a representação de um conjunto de genes em relação a uma determinada função biológica. Sendo calculado como a razão da proporção de genes em uma condição específica associado a um termo GO em relação à proporção esperada de genes relacionados a esse termo em um conjunto de referência (Khatri *et al.*, 2012).

5. Resultados

5.1 Desafio bacteriano

Ao decorrer do desafio por *Flavobacterium oreochromis*, os primeiros sinais clínicos surgiram a partir das 24 horas, evidenciando aumento de muco na água do grupo infectados e alguns indivíduos com hiperpigmentação. A partir de 48 h após desafio, a taxa de mortalidade atingiu 70%, e os sinais clínicos evidenciaram letargia, hipóxia (com lesões nas brânquias verificadas em necrópsia), perda de escamas, corrosão de nadadeiras, lesões hemorrágicas em região anal e na base da nadadeira e lesões ulcerativas em formato de sela na região dorsal e em região caudal (Fig. 1 A – B).

Após 72 h houve a taxa de mortalidade atingiu 100 % dos indivíduos. A *F. oreochromis* foi isolada e identificada por MALDI-ToF (Assis *et al.*, 2017), em diferentes órgãos (cérebro, rim e pele) de todos os animais analisados, confirmando a infecção bacteriana por esse patógeno. Os indivíduos do grupo controle não apresentaram sinais

clínicos e mortalidade. Ao final do experimento todos os indivíduos foram devidamente descartados de acordo com as recomendações do CEUA e as normas de biossegurança.

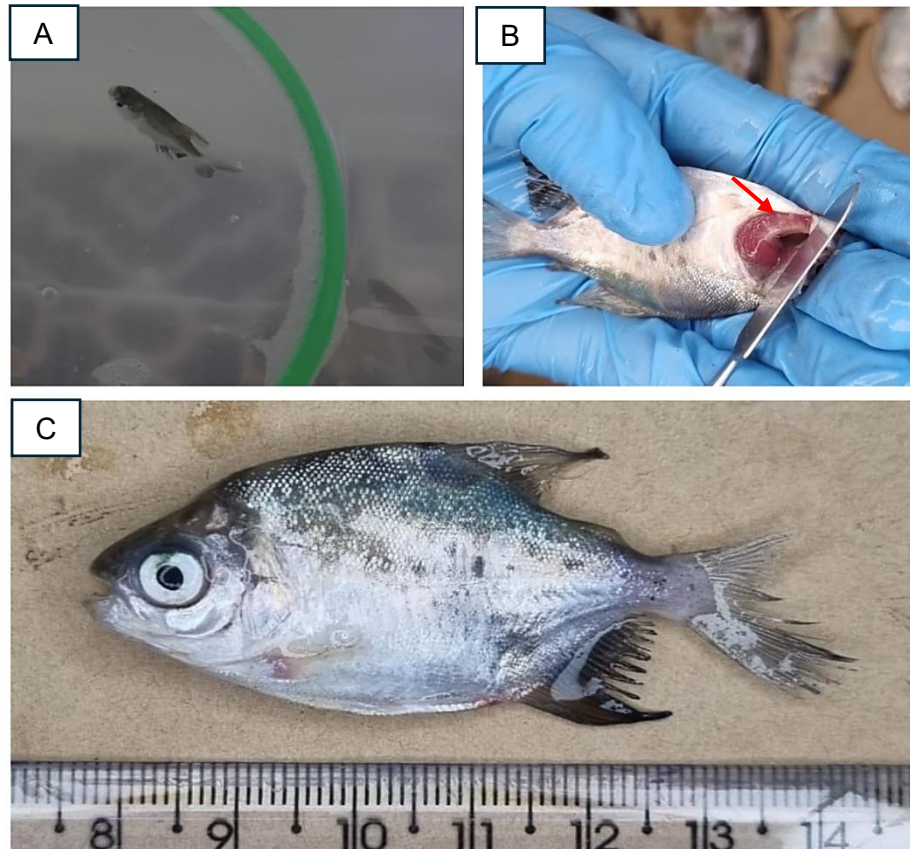


Figura 1. Água com excesso de muco; indivíduo manifestando letargia, hipóxia e hiperpigmentação (A); Lesão na brânquia (seta) (B); Lesão em formato de sela próximo a nadadeira dorsal, corrosão de nadadeira e tegumento na região caudal.

5.2 Sequenciamento do RNA

O sequenciamento de RNA das amostras de pele gerou aproximadamente 24 milhões de leituras *pair-end* por biblioteca. Posteriormente as leituras brutas foram filtradas para remover sequências de adaptadores, contaminação e leituras de baixa qualidade (inferior a 36 bp e $Q\text{ Phred} < 30$), de acordo com a Tabela 1. O processo de mapeamento das sequências do RNA-seq ao genoma de referência através do STAR resultou em média de 21 a 22 milhões de leituras por amostra (91-92%), com 290 bp de comprimento médio mapeado (Tabela 2). Posteriormente, os transcritos foram processados no software Rsem

contabilizando uma matriz de abundância em transcritos por milhões (TPM) composta por 30.268 genes ou isoformas para cada condição (Controle - CTR e Infectados assintomáticos – IA; Controle -CTR e Infectados sintomáticos - IS).

Tabela 1. Quantidades das leituras brutas e leituras limpas posterior ao controle de qualidade

Condição	Leituras brutas	Leituras limpas
Controle	24060858	23287470
Assintomático	24146713	23330427
Assintomático	24008980	23190546
Assintomático	24101273	23400727
Assintomático	24107788	23312082
Assintomático	24093959	23360576
Sintomático	24008157	23254038
Sintomático	24078201	23348002
Sintomático	24089984	23262142
Sintomático	24027287	23343933

Tabela 2. Mapeamento das leituras das condições IA e IS no genoma do tabaqui

Condição	Leituras mapeadas	Tamanho médio mapeado
Controle	22052492 (94.70%)	298.25
Assintomático	22161363 (94.99%)	298.12
Assintomático	21750825 (93.79%)	298.15
Assintomático	22211220 (94.92%)	298.09
Assintomático	22034400 (94.52%)	298.09

Assintomático	22018735 (94.26%)	298.00
Sintomático	22125851 (95.15%)	298.06
Sintomático	22233759 (95.23%)	298.13
Sintomático	22023238 (94.67%)	298.24
Sintomático	22185391 (95.04%)	298.20

5.3 Análises de componentes principais

A análise dos componentes principais (PC1 e PC2) dos grupos CTR e IA evidenciou 78% de variância total entre os dados. Nos grupos CTR e IS a variância total foi de 83%. Os primeiros componentes (PC1) revelaram uma variância de 64% entre os grupos CTR e IA (Fig. 2), como também 67% de variância para CTR e IS (Fig. 3). Os segundos componentes (PC2), que correspondem à similaridade intragrupo, apontaram uma variância de 14% no grupo infectados assintomáticos e 18% de variação nos sintomáticos.

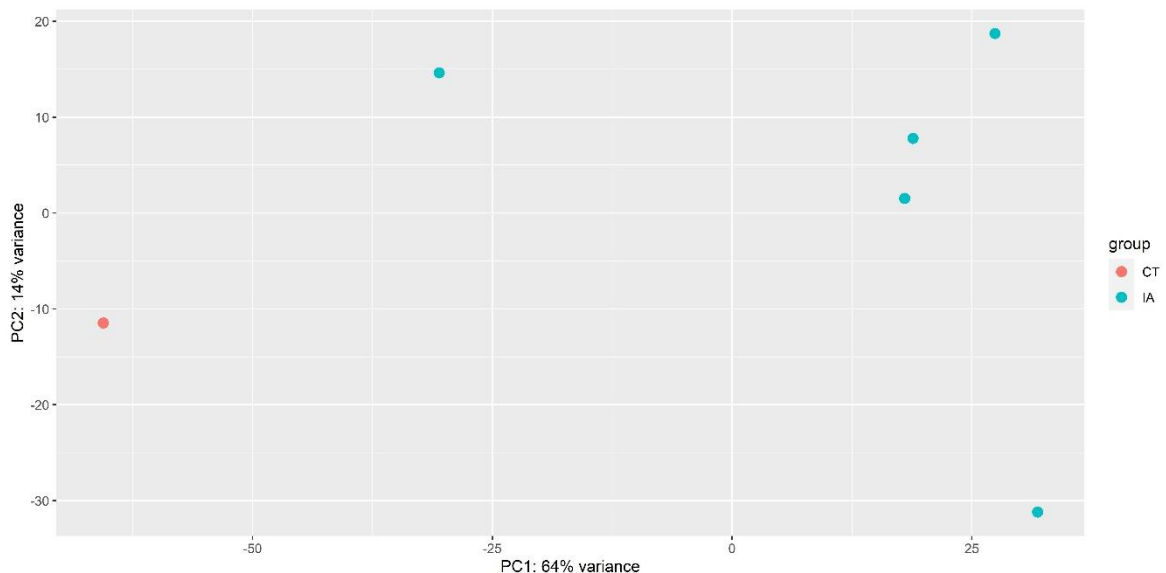


Figura 2. Gráfico de componentes principais dos grupos controle e indivíduos assintomáticos (IA). Pontos em azul representam o grupo resistente e pontos em vermelho o grupo controle, o eixo x (PC1) indica a variância entre os grupos controle e resistente e o eixo y (PC2) representa a variância dentro do grupo resistente.

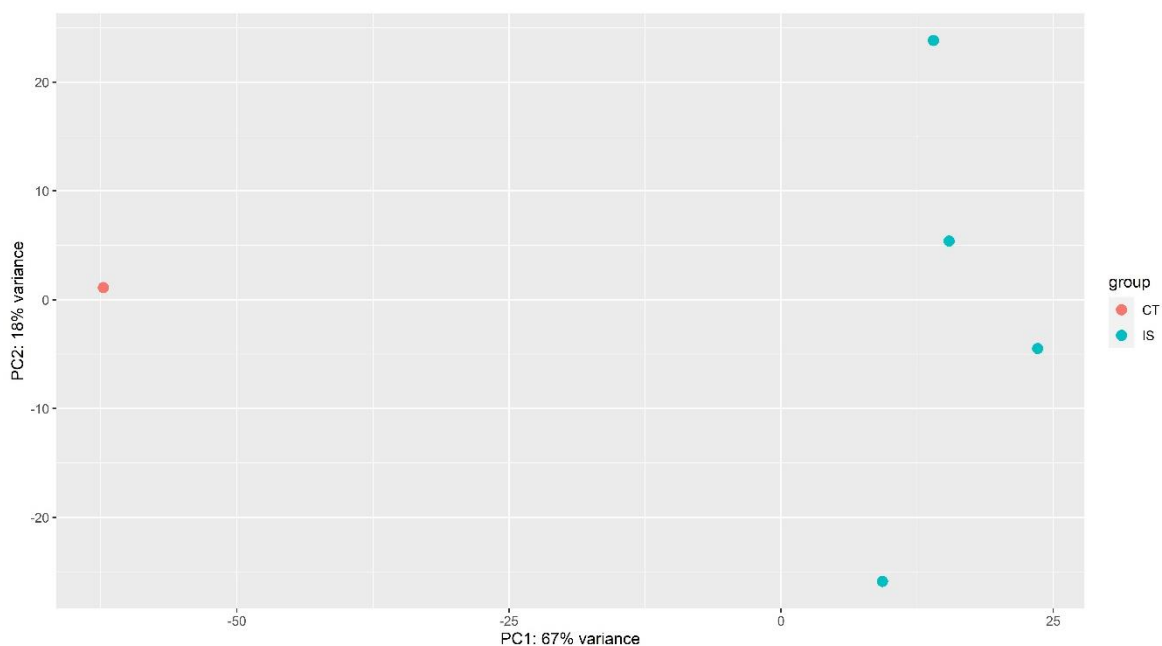


Figura 3. Gráfico de componentes principais dos grupos controle e infectados sintomáticos (IS) . Pontos em azul representam o grupo susceptível e pontos em vermelho o grupo controle, o eixo x (PC1) representa a variância entre os grupos controle e susceptíveis e o eixo y representa a variância dentro do grupo susceptível.

5.4 Identificação de genes diferencialmente expressos

A expressão diferencial entre as amostras correspondentes aos grupos CTR e IA resultaram em 24.053 genes expressos diferencialmente, no qual 1.358 (5.6 %) foram representados como superexpressos (*up-regulated*) e 488 (2%) foram sub-expressos (*down-regulated*) considerando o p-valor ajustado < 0.05 , $\log_2FC > |1|$ (Tabela 2). Adicionalmente, a expressão diferencial entre os grupos CTR e IS geraram um total de 23.545 genes diferencialmente expressos, abrangendo 2.470 (10%) superexpressos (*up-regulated*) e 1.305 (5.5%) sub-expressos (*down-regulated*) p-valor ajustado < 0.05 , $\log_2FC > |1|$ (Tabela 3).

Tabela 3. Número de transcritos expressos diferencialmente em tabaquis desafiados com *Flavobacterium oreochromis*.

Grupos	D.E ($p_{adj} \leq 0.05$)	Superexpresso (LFC > 1)	Subexpresso (LFC < -1)
IA x CTR	1.846	1.358	488

IS x CTR	4.295	2.701	1.594
-----------------	-------	-------	-------

D.E = Diferencialmente expressos; IA = Indivíduos assintomáticos; IS = Sintomatic individuals

5.5 Análise de enriquecimento funcional de genes diferencialmente expressos

Os resultados do enriquecimento funcional dos genes expressos diferencialmente foram classificados em 3 categorias: Função molecular, componente celular e processo biológico. A análise de GO revelou o enriquecimento de genes semelhantes nas duas condições (sintomáticos e assintomáticos) nas 3 categoriais analisadas. Os termos GO mais representados na condição de assintomático foram: *proteasomal protein catabolic. proc., autophagy, proc. utilizing autophagy mechanism, ribosome biogenesis* (processo biológico) (Fig. 4 – A); *proteasome-activating activity, insulin receptor binding e threonine-type endopeptidase activity* (função molecular) (Fig. 4 – B); *proteasome core complex alpha-subunit complex, proteasome regulatory particle e proteasome core complex* (componente celular) (Fig. 4 – C). Na condição de sintomático os termos mais abundantes foram: *Autophagy, proc. utilizing autophagy mechanism e ribosome biogenesis* (processo biológico) (Fig. 5 – A); *proteasome-activating activity, polyubiquitin modification – dependente protein binding e RNA polymerase II complex binding* (função molecular) (Fig. 5 – B); *proteasome core complex alpha-subunit complex, proteasome regulatory particle e proteasome core complex* (componente celular) (Fig. 5 – C).

Os principais termos GO menos enriquecidos na condição de assintomático foram: *membrane raft assembly, membrane raft organization e plasma membrane raft assembly* (processo biológico) (Fig. 4 – D); *L-lactate dehydrogenase activity, Bisphosphoglycerate mutase activity and lactate dehydrogenase activity* (função molecular) (Fig. 4 – E); *collagen type V trimer, Fibrillar collagen trimer e Banded collagen fibril* (componente celular) (Fig. 4 – F). E na condição de sintomático: *myotube cell development, skeletal fiber development e myotube differentiation* (processo biológico) (Fig. 5 – D); *collagen binding, intramolecular transferase activity phosphotransferases and extracelular matrix structural constituent* (função molecular) (Fig. 5 – E); *fibrillar collagen trimer, banded collagen fibril e Caveola* (componente celular) (Fig. 5 – F).

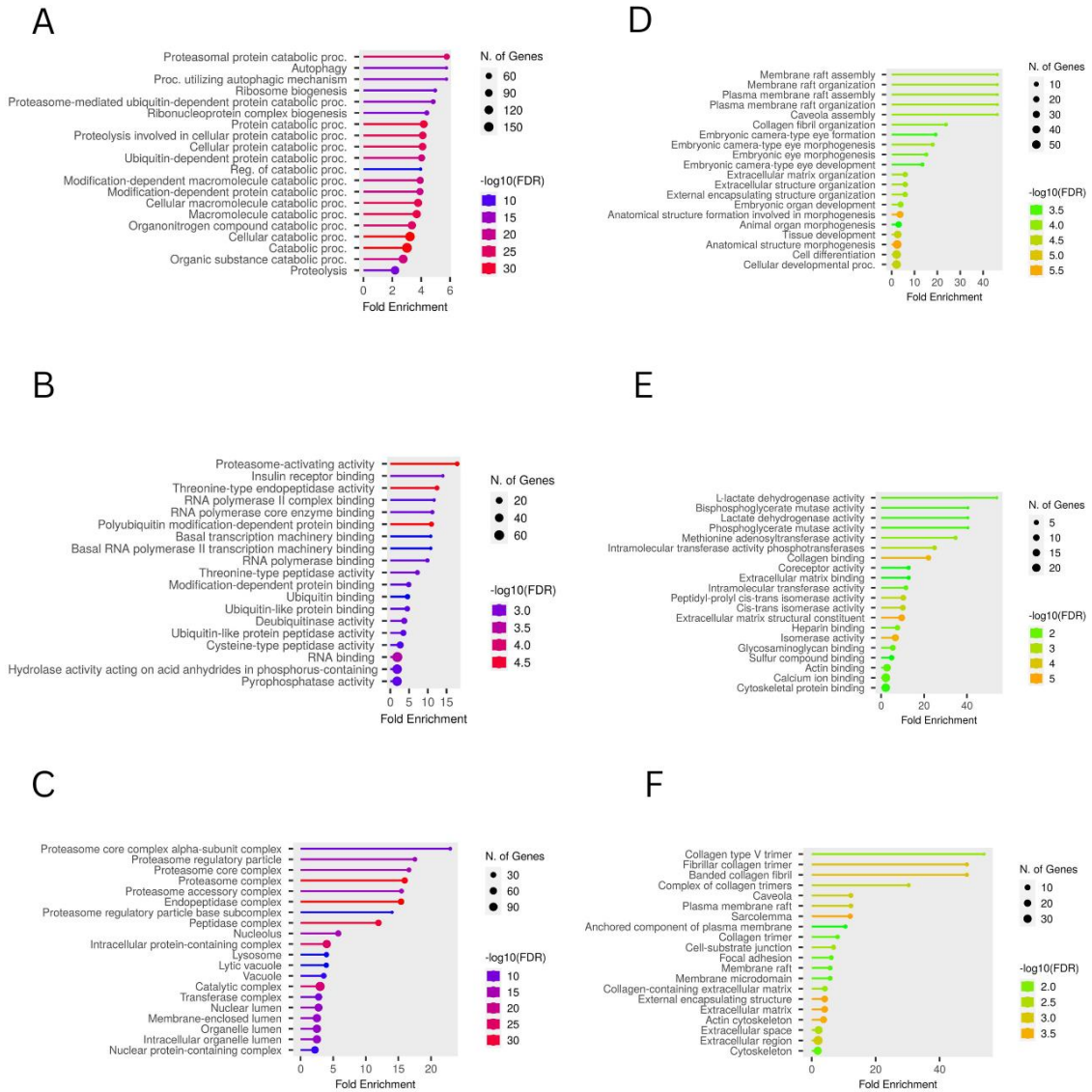


Figura 4 – Barplots do enriquecimento funcional na condição IA – Indivíduos assintomáticos. Classificados nas categorias: processo biológico (A), função molecular (B) e componente celular (C). Mecanismos menos enriquecidos estão representados ao lado do mais representados: processos biológicos (D), função molecular (E) e componente celular (F). A classificação dos transcritos é baseada nas categorias do Gene Ontology, e a significância de cada transcrito é indicada pelo valor $-\text{Log}_{10}$ FDR. A escala de Fold Enrichment é utilizada para representar o grau de enriquecimento funcional.

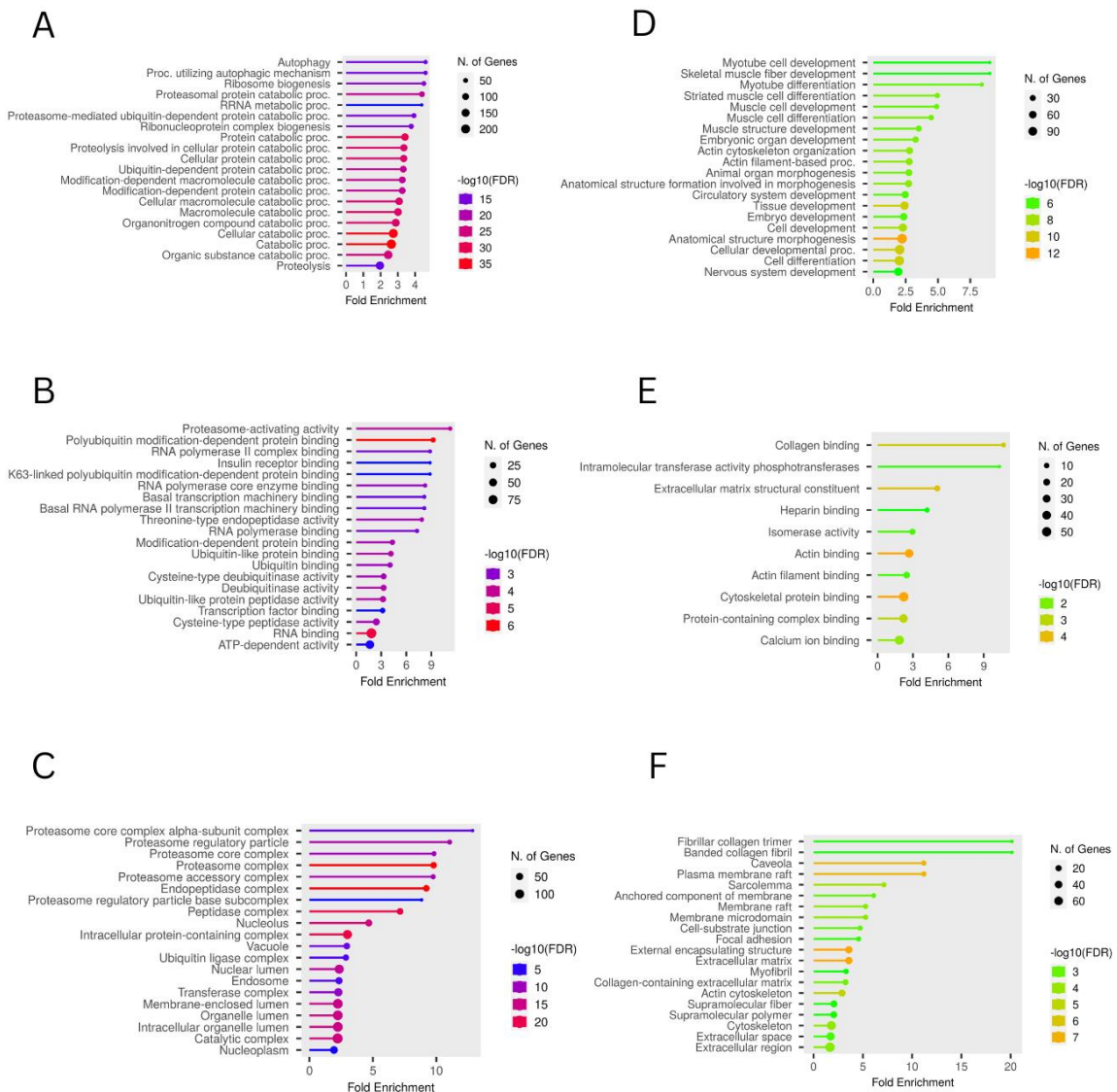
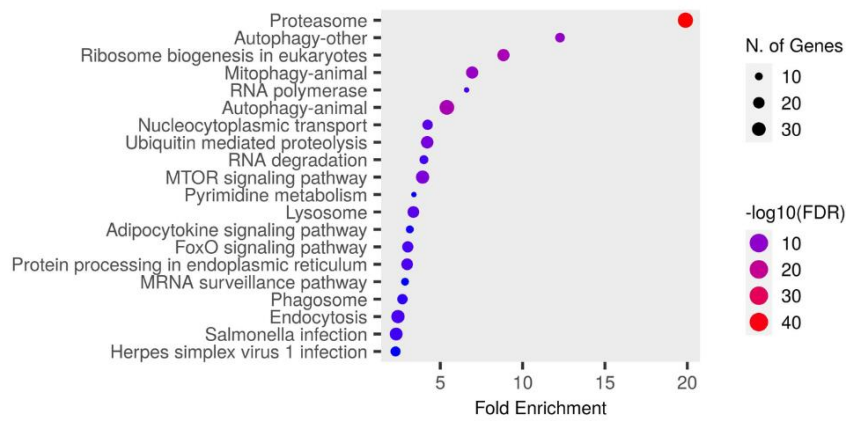


Figura 5 – Barplots do enriquecimento funcional na condição IS – Indivíduos sintomáticos. Classificados nas categorias: processo biológico (A), função molecular (B) e componente celular (C). Mecanismos menos enriquecidos estão representados ao lado do mais representados: processos biológicos (D), função molecular (E) e componente celular (F). A classificação dos transcritos é baseada nas categorias do Gene Ontology, e a significância de cada transcrito é indicada pelo valor $-\text{Log}_{10}$ FDR. A escala de Fold Enrichment é utilizada para representar o grau de enriquecimento funcional.

As vias do KEGG mais representadas revelaram resultados semelhantes para as duas condições (sintomáticos e assintomáticos). Um total de 20 processos foi identificado para a condição IA, no entanto os mecanismos de proteassomas e autofagia foram os principais processos super-representados em IA (Fig. 6 – A). Para o grupo IS 20 vias foram relacionadas, sendo evidenciado mecanismo de proteassomas como o principal super-representado, seguido do processo de biogênese do ribossomo em eucariotos (Fig. 7 – A).

Um total de 8 vias foram reveladas como menos enriquecidas para IA e IS, os mecanismos “*focal adhesion* e *ECM-receptor interaction*” foram menos representados para ambas as condições (Fig.6 – B; Fig. 7 – B).

A



B

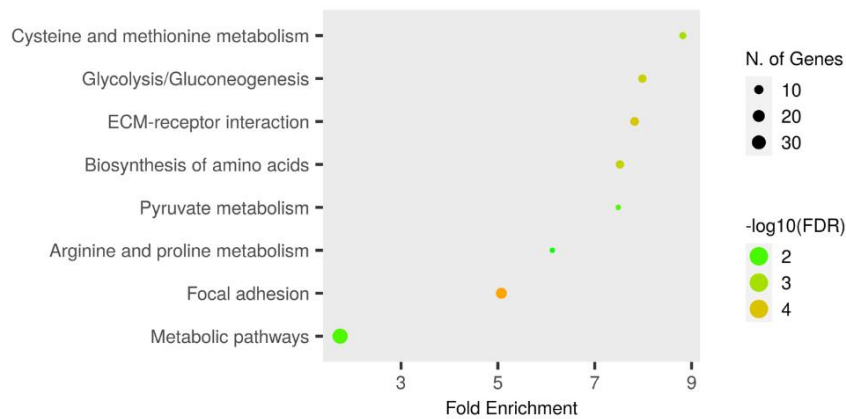
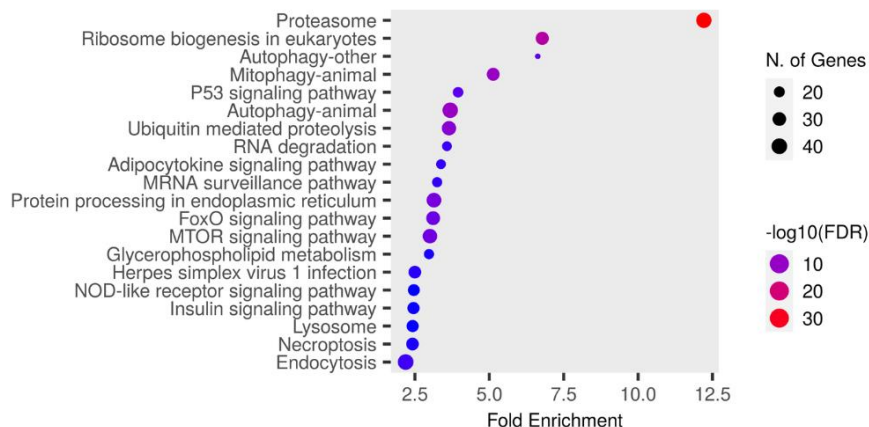


Figura. 6 – Transcritos abundantes (A) e menos abundantes (B) atribuídos a cada via KEGG na condição de infectados assintomáticos - IA. A significância de cada transcrito é classificada de acordo com $-\log_{10} \text{FDR}$ e a escala de *Fold Enrichment*.

A



B

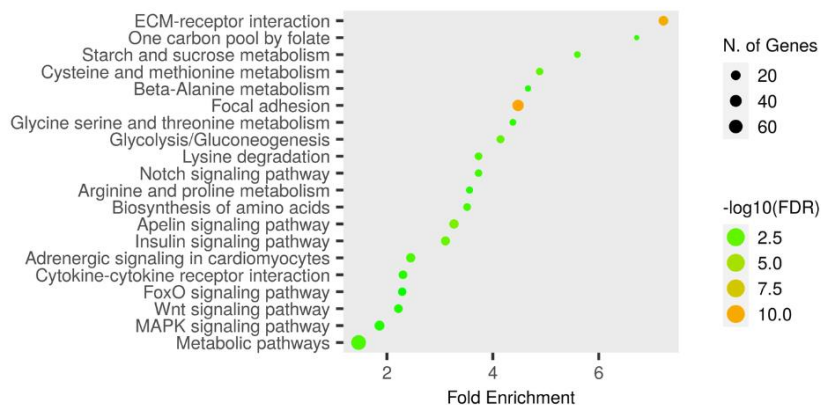


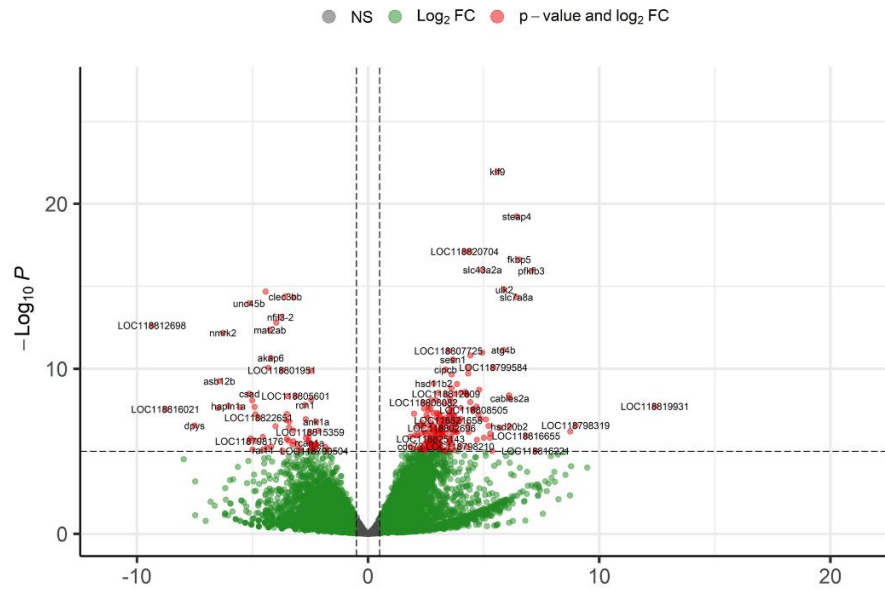
Figura. 7 – Transcritos abundantes (A) e menos abundantes (B) atribuídos a cada via KEGG na condição de infectados sintomáticos - IS. A significância de cada transcrito é classificada de acordo com $-\log_{10} \text{FDR}$ e a escala de *Fold Enrichment*.

5.6 Genes diferencialmente expressos

De acordo com a análise de genes expressos diferencialmente (Fig. 8 A – B), o transcrito *klf9* foi regulado positivamente nas duas condições estudadas, envolvido em processo de proliferação celular e estresse oxidativo. Assim como os principais genes superexpressos em sintomáticos que também relacionados ao estresse oxidativo como: *txnipa* e *ddit4*. Outros principais genes descritos como superexpressos na condição de assintomáticos estão associados ao processo de autofagia, sendo eles *atg4b* e *ulk2*.

Alguns genes do principais como o *unc45b*, *akap6* e *rcn3* que estão relacionados a estrutura musculo esquelética, mostraram-se regulados negativamente tanto na condição de assintomáticos como sintomáticos. No contexto de sintomáticos, outros genes subexpressos identificados foram *spon2b* e *thrap3a*. Na condição de assintomáticos identificou-se como genes de menor expressão como *nmrk2*, *clec3bb* e *fkbp10a*

A



B

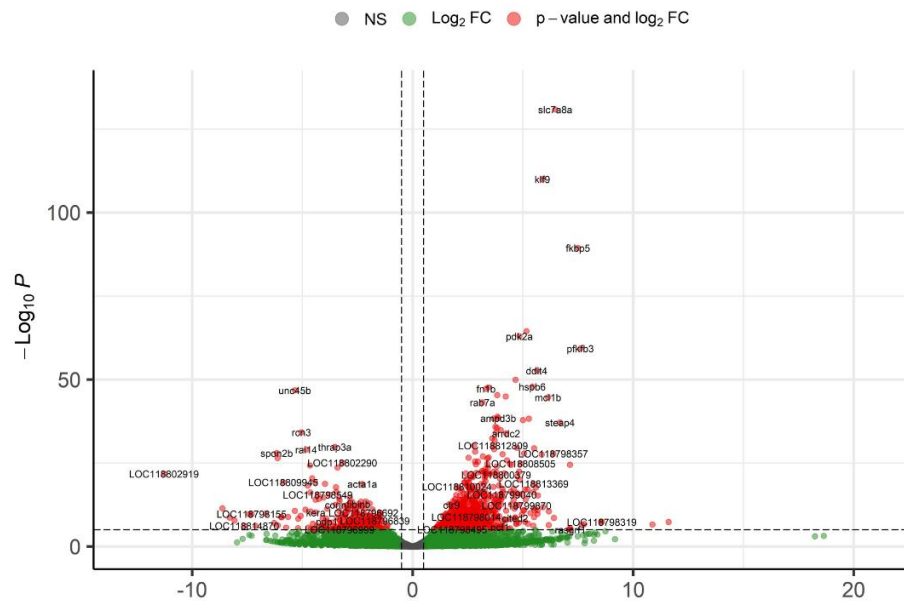


Figura 8. Volcano plots entre grupo controle – CT e infectados assintomáticos – IA (A) e entre controle e infectados sintomáticos – IS (B). Cada ponto representa a expressão (eixo X, Log₂ fold change) e a

significância (eixo Y, - Log₁₀ P) de cada transcrito. Os transcritos com expressão diferencial (adjusted p-value < 0.05) estão destacados em vermelho, localizados como pontos mais distantes do centro e da aglomeração entre outros pontos (região esquerda corresponde a subexpressos e região direita superexpressos).

6. Discussão

Este estudo caracteriza, pela primeira vez, mecanismos moleculares envolvidos na resposta imunológica de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a fase aguda de infecção por *Flavobacterium oreochromis*. A fase inicial de uma patologia, também chamada de fase aguda, traz informações relevantes a respeito da progressão da imunidade inata e sua relação com a imunidade adaptativa (Bayner & Gerwick, 2001). Diversos estudos têm sido conduzidos sobre o transcriptoma do perfil imunológico na fase aguda de outras espécies de peixes acometidas por diferentes bactérias emergentes em pisciculturas de diversas regiões (Liu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Peatman *et al.*, 2007), evidenciando achados que eram pouco conhecidos sobre a modulação da resposta imune.

A modulação da resposta imunológica pode variar entre espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie. Tais fatores podem ser atribuídos a variabilidade genética, que pode induzir respostas fisiológicas diferentes para cada organismo (Buchamann & Secombes, 2022; Rauta; Nayak & Das, 2012; Magnadóttir, 2006; Bowden *et al.*, 2007). Como observado nas análises de componentes principais, que evidenciaram uma pequena diferença de resposta intragrupos dos IS e IA. Isso pode estar relacionado a características do perfil imunológico de cada indivíduo.

Não foi evidenciado super expressão de genes relacionados ao sistema complemento, uma das funções desse sistema envolve opsonização, lise e inflamação, desempenhando um papel crucial na ligação entre imunidade inata e adaptativa (Mokhtar *et al.*, 2023). Em diferentes espécies de peixes, o sistema complemento é descrito como um dos principais mecanismos imunológicos para eliminação de bactérias (Mokhtar *et al.*, 2023; adicionar mais autores), inclusive em estudos com outras espécies nativas brasileira como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), infectados por *Aeromonas hydrophila* (Mastrochirico-Filho *et al.*, 2020) Os mecanismos de defesa ativados pela *F. oreochromis* foram semelhantes para o IA e para IS, evidenciando processos proteossômicos e autofagia como super-representados e superexpressos e transcritos relacionados ao desenvolvimento de componente musculoesquelético como pouco representados e subexpressos nas duas condições. Os

resultados desse estudo são semelhantes a análises transcriptômicas em outras espécies de peixes infectados por *Flavobacterium* (Rivas-Aravena *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2014). Para melhor compreensão, destacamos os principais genes diferencialmente expressos envolvidos na fisiopatologia da *F. oreochromis*, sendo agrupados em categorias com base nos mecanismos moleculares relacionados.

6.1 Autofagia

O mecanismo de autofagia tem sido descrito como primordial em importantes processos fisiológicos e patológicos, como observado em desenvolvimento, proliferação, diferenciação e homeostase celular (Pant *et al.*, 2022). É um mecanismo chave para a ativação da imunidade inata e adaptativa, podendo ser uma efetiva defesa contra bactérias (Luo *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2019).

Foram identificados genes significativamente upregulados relacionados ao mecanismo da autofagia. Como o gene *atg4b* (*Autophagy-related protein 4 homolog B*) envolvido na modificação da proteína LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), que desempenha papel na estrutura de autofagossomos (vesículas envolvidas na degradação celular) (Kunduu *et al.*, 2018). Assim como o *ulk2* (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 2*), atua como componente do complexo de iniciação da autofagia. Observou-se a superexpressão nas condições de IS e IA sugerindo relevância na fisiopatologia da infecção por *F. oreochromis*.

Embora a autofagia esteja relacionada como um mecanismo de defesa imune, é essencial a regulação adequada para que se mantenha uma homeostase constante promovendo a sobrevivência do hospedeiro. Uma vez que, mecanismo de diferenciação celular que medeiam a ligação da imunidade inata e adquirida só iniciam a partir de um nível de expressão adequado que ainda não é muito bem compreendido em peixes teleósteos (Xia *et al.*, 2019; Liu, Pham, *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2015).

Possivelmente, a superexpressão de genes associados à autofagia interage fortemente com mecanismos proteossômicos também evidenciado como super-representados nas duas condições IA e IS. De acordo com a literatura, a autofagia pode ser induzida por estresse oxidativo em condições de manifestações patológicas como isquemia e reperfusão e regulada fortemente por alterações em espécies reativas de oxigênio (ROS) (Matsui *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012).

6.2 Proteassomas

Os proteassomas são complexos proteicos associados a degradação de proteínas não funcionais. Atuam na manutenção da homeostase celular, realizando a remoção de proteínas danificadas que possam prejudicar o funcionamento adequado da célula (Yasuda *et al.*, 2020). O fator de transcrição *nrf2* (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) atua como regulador dessa via e pode atuar como regulador em condições de estresse oxidativo e repostas inflamatórias (Chapple *et al.*, 2012)

O *Krüppel-like factor 9* (*klf9*) desempenha a função de proliferação e diferenciação de células como macrófagos/monócitos e células B. Sua expressão pode ser aumentada por indução do *nrf2* em condições massivas de estresse oxidativo (Zucker *et al.*, 2014; Mannava *et al.*, 2012). Em condições de subexpressão esse gene atua como mediador na resposta imune inata do salmão (*Salmo salar*), como regulador positivo na diferenciação de macrófagos/monócitos estabelecendo ligação para imunidade adquirida (Pérez-Stuardo *et al.*, 2023; Smith *et al.*, 2021).

Tecidos de grupos infectados por *Nervous necrosis virus* (RGNNV) e *Singapore grouper iridovirus* (SGIV) a superexpressão desse gene promoveu uma inibição de processos inflamatórios favorecendo a replicação de RGNNV e SGIV, sugerindo que sua superexpressão reduz a liberação de citocinas inflamatórias que seriam cruciais para a homeostase do organismo (Xia *et al.*, 2019). No presente estudo, o *klf9* foi destacado como superexpresso nas condições IS e IA. Além disso, outros genes associados a estresse oxidativo também foram identificados como o *txnipa* (*Thioredoxin-interacting protein*) identificado em IS e IA e o gene *ddit4* (*DNA damage-inducible transcript 4 protein*) identificado em IS. Sugerindo a presença de estresse oxidativo em ambas as condições, o qual possivelmente se intensificava à medida que a infecção avançava, suprimindo mecanismos imunes mais especializados.

Possivelmente esse cenário possa estar envolvido na patogênese da infecção, uma vez que estudos descrevem mecanismos de bactérias como *Aeromonas hydrophila* (Jiang *et al.*, 2016), *Providencia rettgeri* (Souza *et al.*, 2019), *Pseudomonas aeruginosa* (Souza *et al.*, 2017), capazes de induzir intenso stress oxidativo e inibição do sistema antioxidante, favorecendo o agravo do quadro clínico e mortalidade do hospedeiro.

6.3 Interação do Receptor com a Matriz Extracelular (ECM) e Adesão focal

Genes associadas a Interação entre a matriz extracelular e adesão focal foram significativamente downregulados em IS e IA. Outros termos GO como *Fibrillar collagen trimer* e *Banded collagen fibril* associados a matriz extracelular também foram significativamente upregulados. As vias *ECM-receptor interaction* e *focal adhesion* são relacionadas a processos e estruturas de interação entre células e a matriz celular (Godoy *et al.*, 2015). O ECM se refere à integração entre células e componentes da matriz celular (Hynes, 2009). As adesões focais medeiam a ligação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto celular (Liu *et al.*, 2023)

Os genes *unc45b* (*Unc-45 Myosin Chaperone*) e *akap6* (*A-kinase anchor protein 6*) que apresentam relação com desenvolvimento da estrutura corporal como tecido muscular, esquelético e tegumento (Gao *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2015) foram identificados em IS e IA. Assim como a subexpressão de outros genes relacionados ao desenvolvimento musculo esquelético como *rai14* e *spon2b*, identificado apenas em IS. Dessa forma, as subexpressões foram mais frequentes em IS do que IA, essa resposta pode ter associação com a ineficiência da cicatrização, observada pelas lesões no tegumento e nadadeiras causadas pela *F. oreochromis*, principalmente no grupo IS. Resultados semelhantes foram reportados em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), onde os transcritos subexpressos estavam relacionados a atrofia musculo esquelética causada pela *Flavobacterium psychrophilum* (Rivas-Aravena *et al.*, 2019).

7. Conclusão

Os resultados sugerem que o processo de autofagia e estresse oxidativo está relacionado a um mecanismo de homeostase do tambaqui durante a fase aguda causada por *F. oreochromis*. A progressão de mecanismos imunológicos mais eficientes parece ser pouco desenvolvida, possivelmente associada a desequilíbrios nos mecanismos moleculares envolvidos na homeostase, o que pode prejudicar a progressão da imunidade inata e adquirida. Além disso, *F. oreochromis* pode estar envolvida em estratégias de supressão de vias e/ou mecanismos imunes. No entanto, para uma compreensão mais aprofundada da interação hospedeiro-patógeno, são necessários mais estudos relacionados a análises proteômicas, avaliação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e sistema antioxidante do hospedeiro. Esses achados fornecem informações básicas sobre a imunogenética do

tambaqui durante a fase aguda da columnariose, os quais colaboram para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas para a espécie.

Referências

- Assis, G. B., Pereira, F. L., Zegarra, A. U., Tavares, G. C., Leal, C. A., & Figueiredo, H.C. Uso da espectrometria de massa MALDI-TOF para a identificação rápida de patógenos gram-positivos de peixes. *Frontiers in microbiology* , 8 , 1492, 2017.
- Andrews, S., 2010. Fast QC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Chapple, S.J., Richard C. M., Mann, G. E., 2012. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: Therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 44, Issue 8.
- Chen, L., Huang, R., Li, Y., Li, Y., Li, Y., Liao, L., He, L., Zhu, Z., Wang, Z., 2021. Genome-wide identification, evolution of Krüppel-like factors (klfs) and their expressions during GCRV challenge in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Developmental & Comparative Immunology*, Volume 120.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J., 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics*, Volume 34, Issue 17, Pages i884–i890, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Bowden, T. J., Thompson, K. D., Morgan, A. L., Gratacap, R. M. l., Nikoskelainen, S., 2007. Seasonal variation and the immune response: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology* , 695 – 706.
- Buchmann, K., Secombes, C. J., 2022. Principles of Fish Immunology. *Springer Nature*.
- Declercq, A. M, Haesebrouck, F., Broeck, W. V., Bossier, P., Decostere, A., 2013. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research*. 44-27.
- Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L. A., 1998. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. *Veterinary Microbiology*. 62, 35-45.
- Dong, K., Chen, F., Du, Y., Wang, G., 2013. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 886–892.

- Dobin A., Davis C. A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S, B. P., Chaisson M., Gingeras T. R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. ;29(1):15-21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Gao, Y., Yoshida, A., Liu, J., Shimizu, T., Shiota, K., Shiina, Y., Osatomi, K., 2021. Molecular cloning and expression dynamics of UNC-45B upon heat shock in the muscle of yellowtail, *Aquaculture*, Volume 541.
- Gomes, L. C., & Silva, C. R., 2009. Impact of pond management on tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier), production during growth-out phase. *Aquaculture Research*, 40(7), 825-832.
- Goody, M. F., Sher, R. B., Henry, C. A., 2015. Hanging on for the ride: Adhesion to the extracellular matrix mediates cellular responses in skeletal muscle morphogenesis and disease, *Developmental Biology*, Volume 401.
- Hynes, R. O., 2009. The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science*, Vol 326, Issue 5957.
- Ibge (2022). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>
- Iliev, D. B., Goetz, G. W., MacKenzie, S., Planas, J. V., Goetz, F. W., 2006. Pathogen-associated gene expression profiles in rainbow trout macrophages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, Volume 1, Issue 4.
- Jiang, W., Hu, K., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Zhao, J., Zhang, Y., Zhou, X. Q., Feng, L., 2016. Dietary myo-inositol modulates immunity through antioxidant activity and the Nrf2 and E2F4/cyclin signalling factors in the head kidney and spleen following infection of juvenile fish with *Aeromonas hydrophila*, *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 49.
- Khatri, P., Sirota, M., Butte, A. J. 2012. Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS computational biology*, 8(2), e1002375.
- Lange, M. D., Farmer, B. D., Declercq, A. M., Peatman, E., Decostere, A., & Beck, B. H., 2017. Sickeningly Sweet: L-rhamnose stimulates *Flavobacterium columnare* biofilm formation and virulence. *Journal of fish diseases*. 40(11), 1613-1624.
- Lee, J., Giordano, S., Zhang, J. 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 15 January.

- Li, B., Dewey, C.N., RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome., (2011). *BMC Bioinformatics* 12, 323.
- Liu, H., Hu, X., Lian, Z., Luo, Z., Lv, A., Tan, J., 2023. Focal adhesion signaling pathway involved in skin immune response of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* to *Vibrio vulnificus* infection, *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 135.
- Loch T. P., Faisal M., 2014. Emerging flavobacterial infections in fish: A review, *J Adv Res.*
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15(12), 1–21.
- MacKenzie S, Iliev D, Liarte C, Koskinen H, Planas JV, Goetz FW., 2006. Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol. *Mol Immunol.*
- Mannava, S., Zhuang, D., Nair, J.R., Bansal, R., Wawrzyniak, J.A., Zucker, S.N., Fink, E.E., Moparthy, K.C., Hu, Q., Liu, S. 2012. KLF9 is a novel transcriptional regulator of bortezomib- and LBH589-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Blood* 119, 1450–1458.
- Marancik, D., Gao, G., Paneru, B., Ma, H., Hernandez, A. G., Salem, M., Yao, J., Palti, Y., Wiens, G. D., 2015. Whole-body transcriptome of selectively bred, resistant-, control-, and susceptible-line rainbow trout following experimental challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Frontiers in Genetic.* 1–15.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Beth, Levine, Junichi, Sadoshima, 2007. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion roles of AMPactivated protein kinase and beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* 100, 914–922.
- Mielke, T. D., Francisco, C. J., Dorella, F.A., Figueiredo, H. C. P., Tavares, G. C., Gallani, S. U., 2022. The strategic use of water additives for tambaqui *Colossoma macropomum* transport: New insights of bacteriosis and productivity approach. *Aquaculture*, Volume 558.
- Pant, A., Yao, X., Lavedrine, A., Viret, C., Dockterman, J., Chauhan, S., Shi, C., Manjithaya, R., Cadwell, K., Kufer, T. A., Kehrl, J. H., Coers, J., L., Sibley, D. L., Faure, M., Taylor, G. A., Chauhan, M. A., 2022 Interactions of Autophagy and the Immune System in Health and Diseases, *Autophagy Reports*, 1:1, 438-515.

- Peatman, E., Li, C., Peterson, B. C., Straus, D. L., Farmer, B. D., Beck, B. H., 2013. Basal polarization of the mucosal compartment in *Flavobacterium columnare* susceptible and resistant channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Molecular Immunology*, Volume 56, Issue 4, Pages 317-327.
- Peatman, E., Baoprasertkul, P., Terhune, J., Xu, P., Nandi, S., Kucuktas, H., Li, P., Wang, S., Somridhivej, B., Dunham, R., Liu, Z., 2007. Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium. *Molecular Immunology*, Volume 56, Issue 4, Pages 317-327.
- Pérez-Stuardo D., Frazão M., Ibaceta V., Brianson B., Sánchez E., Rivas-Pardo J. A., Vallejos-Vidal E., Reyes-López F. E., Toro-Ascuy D, Vidal E. A, Reyes-Cerpa S., 2023. KLF17 is an important regulatory component of the transcriptomic response of Atlantic salmon macrophages to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Front Immunol*.
- Pinto, N., Nissa, M. U., Mujahidkhan, A. P., Yashwanth, B. S., Pratapa, M.G., Srivastava, S., Goswami, M., 2023. High throughput proteomic analysis of *Labeo rohita* liver infected with *Edwardsiella tarda*, *Aquaculture*, Volume 569.
- Pradhan, P. K., Paria, A., Pande, V., Verma, D. K., Arya, P., Rathore, G., & Sood, N., 2019. Expression of immune genes in Indian major carp, *Catla catla* challenged with *Flavobacterium columnare*. *Fish & shellfish immunology*. 94, 599-606.
- Rauta, P., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters* ,148, 23–3
- Rivas-Aravena, A., Fuentes-Valenzuela, M., Escobar-Aguirre, S., Gallardo-Escarate, C., Molina, A., Valdés, J. A., 2019. Transcriptomic response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skeletal muscle to *Flavobacterium psychrophilum*, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*,
- Singh, S., Mallik, S. K., Kala, K., Shahi, N., Pathak, R., Giri, A. K., Chandra, S., Pant, L., Patiyl, R. S., 2021. Characterization of *Flavobacterium columnare* from farmed infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) of Central Indian Himalayan region, India, *Aquaculture*, Volume 544, 737118, ISSN 0044-8486.
- Smith N. C., Navaneethaiyer, U., Kumar, S., Woldemariam, N. T., Rune, A., Christian, S. L., Rise, M. L., 2021. Transcriptome Profiling of Atlantic Salmon Adherent Head Kidney

Leukocytes Reveals That Macrophages Are Selectively Enriched During Culture. *Frontiers in Immunology*, volume 12.

Steven X. G., Dongmin, J., Runan Y., 2020. GO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants, *Bioinformatics*, Volume 36, Issue 8, Pages 2628–2629, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>

Stockhammer, O. W., Rauwerda, H., Wittink, F.R., Breit, T. M., Meijer, A. H., Spaink, H. P. 2010. Transcriptome analysis of Traf6 function in the innate immune response of zebrafish embryos, *Molecular Immunology*, Volume 48, Issues 1–3.

Souza, C. F., Baldissera, M. D., Verdi, C. M., Santos, R. C. V., Rocha, M. I. U., Veiga, M. L., Silva, A. S., Baldisserotto, B., 2019. Oxidative stress and antioxidant responses in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* experimentally infected by *Providencia rettgeri*, *Microbial Pathogenesis*, Volume 131.

Souza, C. F., Baldissera, M. D., Guarda, N. S., Bollick, Y. S., Moresco, R. N., Brusque, I. C. M., Santos, R. C. V., Baldisserotto, B., 2017. *Melaleuca alternifolia* essential oil nanoparticles ameliorate the hepatic antioxidant/oxidant status of silver catfish experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbial Pathogenesis*, Volume 108.

Tavares-Dias, M., Martins, M. L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*. 41(4):913–918.

Tongsri, P., Meng, K., Liu, X., Wu, Z., Yin, G., Wang, Q., Liu, M., Xu, Z., 2020. The predominant role of mucosal immunoglobulin IgT in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after infection with *Flavobacterium columnare*, *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 99, Pages 654-662.

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 351-369.

Xia, X., Wang, X., Qin, W., Jiang, J., Cheng, L., 2019. Emerging regulatory mechanisms and functions of autophagy in fish, *Aquaculture*, Volume 511.

Yasuda, S., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Guo, O., Ikeuchi, K., Endo, A., Araj, N., Ohtake, S. M., Inada, T., Baumeister, W., Fernández-Busnadiego, R., Tanaka, K., Saeki, Yasushi. 2020. Stress and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome. *Nature* 578, 296–300 (2020).

- Yu, Y., Li, C., Wang, Y., Wang, Q., Wang, S., Wei, S., Yang, M., Qin, Q., 2019. Molecular cloning and characterization of grouper Krüppel-like factor 9 gene: Involvement in the fish immune response to viral infection. *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 89, Pages 677-686.
- Zhao, L., Tu, J., Zhang, Y., Wang, J., Yang, L., Wang, W., Wu, Z., Meng, Q., Lin, L., 2016. Transcriptomic analysis of the head kidney of Topmouth culter (*Culter alburnus*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on phagosome pathway, *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 57, Pages 413-418.
- Zheng, Y., Wu, W., Hu, G., Zhao, Z., Meng, S., Fan, L., Song, C., Qiu, L., Chen, J., 2018. Hepatic transcriptome analysis of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented with different concentrations of resveratrol, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 147, Pages 447-454.
- Zhou, W., Zhang, Y., Wen, Y., Ji, W., Zhou, Y., Ji, Y., Liu, X., Wang, W., Asim, M., Liang, X., Ai, T., Lin, L., 2015. Analysis of the transcriptomic profilings of Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on immune responses, *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 43.
- Zucker, S. N., Fink, E. E., Bagati, A., Mannava, S., Bianchi-Smiraglia, A., Bogner, P. N., Nikiforov, M. A. 2014. Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9. *Molecular cell*, 53(6), 916-928.